

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Александра А. Павићевић

**Примена електронске парамагнетне
резонантне спектроскопије за
испитивање конформационих
промена албумина методом спинског
обележавања**

докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Aleksandra A. Pavićević

**Application of electron paramagnetic
resonance spectroscopy in the study of
albumin conformational changes by
spin-labeling method**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Ментор:

др Милош Мојовић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију

Чланови комисије:

др Милош Мојовић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Ана Поповић-Бијелић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Маријана Петковић, научни саветник
Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду

Датум одбране докторске тезе: _____

Ова дисертација је урађена на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду у оквиру пројекта финансираног од стране Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије ИИИИ41005 „Биомаркери у неуродегенеративним и малигним процесима“, чији је руководилац др Павле Анђус, редовни професор Биолошког факултета.

Захваљујем се свом ментору, др Милошу Мојовићу, на указаном поверењу, пажњи, успешној дугогодишњој сарадњи, саветима, помоћи и подршци. Такође, захваљујем му се на томе што је подржао моју креативност у научном раду.

Велику захвалност дугујем и др Ани Поповић-Бијелић за корисне савете, помоћ и подршку коју ми је пружила током докторских студија.

Др Маријани Петковић, научном саветнику Института за нуклеарне науке „Винча“, захваљујем се на корисним сугестијама, као и на учешћу у раду Комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем преминулом проф. Горану Бачићу на пруженом корисном знању о ЕПР техници.

Др Марку Даковићу се захваљујем на корисним дискусијама и колегијалној сарадњи током претходних година.

Захваљујем се својим колегама из лабораторије, Ђури, Ђорђу, Игору и Ани на разумевању и моралној подршци.

Такође желим да се захвалим својим родитељима, породици и пријатељима за стрпљење и подршку.

Наслов докторске дисертације:

Примена електронске парамагнетне резонантне спектроскопије за испитивање конформационих промена албумина методом спинског обележавања

Резиме

Серумски албумин је најзаступљенији протеин у крвној плазми, који има више важних физиолошких функција, због чега је детаљно проучаван разним техникама. Једна од техника коришћених за проучавање конформационих промена албумина и његовог капацитета за везивање разних супстанција је електронска парамагнетна резонантна (ЕПР) спектроскопија у спрези са спинским обележавањем. У ту сврху је коришћено неколико различитих спинских обележивача, међу којима су спински обележене масне киселине, с обзиром на то да је албумин главни транспортер масних киселина. Други често коришћени обележивач је 3-малеимидо проксил (5-МСЛ) који се ковалентно везује за слободан цистеин.

У овој докторској дисертацији две спински обележене стеаринске киселине које садрже парамагнетну доксил групу (група од које потиче ЕПР сигнал) на петом (5-доксил стеаринска киселина, 5-ДС) и на шеснаестом (16-доксил стеаринска киселина, 16-ДС) угљениковом атому метиленског ланца су коришћене за проучавање конформационих промена у хуманом серумском албумину (ХСА). Осим тога, конформационе промене у говеђем серумском албумину (БСА) су проучаване обележавањем БСА са 5-МСЛ. Конформационе промене су биле индуковане варирањем температуре и рН, додавањем етанола, везивањем неколико лиганада типичних за албумин (масне киселине и лекови) и излагањем дејству јаких оксидујућих агенаса, водоник-пероксиду и супероксидном ањјонском радикалу. Додатни циљ ове дисертације је био да се испита да ли 5-МСЛ може да се користи за детекцију суптилних конформационих промена узрокованих везивањем лиганада, с обзиром на то да се 5-МСЛ налази у ригидној средини када се веже за једини слободан цистеин у БСА који се налази на позицији 34 у аминокиселинској секвенцији (Cys-34).

Резултати ове дисертације показују да су доксил групе обележивача 5-ДС и 16-ДС (које дају информације о променама у својој околини), лоциране на

различитим местима у ХСА. Наиме, доксил група 5-ДС се налази у хидрофобној унутрашњости ХСА, док је за 16-ДС лоцирана близу површине ХСА или чак пролази кроз њу. Стога, ова два једињења дају информације са различитих места на молекулу ХСА. Такође је уочено да ЕПР спектри оба ДС обележивача везаних за ХСА могу да се разложе на компоненте које одговарају јако (ЈВ), слабо везаном (СВ) и невезаном (НВ) обележивачу. За 5-МСЛ везан за БСА, показано је да се ЕПР спектри састоје из две компоненте, ЈВ и СВ, које потичу од 5-МСЛ везаног за Cys-34 и аминок групе, респективно.

Конформационе промене и у ХСА и у БСА су проучаване мерењем ширине ЕПР спектра, параметра $2A_{\max}$. Такође, за 5-ДС и 16-ДС везане за ХСА, удели три поменуте компоненте (ЈВ, СВ и НВ) у укупном ЕПР спектру су коришћени да би се испитао утицај температуре, рН, етанола, везивања лиганда и оксидативних оштећења на ХСА. Са друге стране, за те потребе су у случају БСА обележеног са 5-МСЛ, коришћена и ротациона корелациона времена ЈВ и СВ компоненте. Резултати добијени на основу ових параметара указују на то да сва три обележивача успешно могу да детектују промене у ХСА и БСА.

Повишена температура изазива повећану флексибилност околине доксил групе у температурском интервалу 25-75 °C за 16-ДС, што је забележено и за доксил групу 5-ДС до температуре 50-55 °C. Овакав резултат је последица одмотавања албумина. Међутим, на температурама вишим од 55 °C, околина доксил групе 5-ДС је постала ригиднија, што је могло да се припише агрегацији протеина. Анализом удела ЈВ, СВ и НВ, уочено је да се при повећању температуре мења расподела молекула 5-ДС и 16-ДС на ХСА. При томе је показано да се смањује количина ЈВ, а расте удео СВ и НВ компонената. За 5-МСЛ/БСА је уочено слично понашање као код 5-ДС/ХСА у погледу флексибилности/ригидности околине Cys-34.

Мењање рН ка киселој или базној средини је, коришћењем сва три обележивача, детектовано као пораст у флексибилности албумина. Као што је примећено у случају конформационих промена индукованих повећањем температуре, варирање рН такође утиче на то да се мења расподела места везивања 5-ДС и 16-ДС у ХСА. Наиме, на нижим и вишим рН вредностима у односу на физиолошку, уочава се пораст количине СВ и НВ компоненте у односу

на рН 7,4. Слични резултати су добијени и у експериментима у којима је испитиван утицај повећања концентрације етанола. Једина разлика у односу на експерименте у којима је проучаван утицај рН, је уочена за 16-ДС, чија је вредност $2A_{\max}$ расла са повећањем концентрације етанола, што може да буде последица, или повећане ригидности, или повећане поларности околине доксил групе 16-ДС, која је последица одмотавања албумина.

Везивање пет масних киселина (лауринске, миристинске, палмитинске, стеаринске и цис-олеинске) је изазвало промене у расподели 5-ДС и 16-ДС у молекулу ХСА, при чему је показано да количина СВ и НВ компоненте расте са повећањем моларног односа [масна киселина]:[ХСА]. Такође, због промена у везивању 5-ДС и 16-ДС за ХСА у присуству масних киселина, биле су уочене и промене у поларности/флексибилности околине места везивања ова два обележивача. Проучавањем БСА обележеног са 5-МСЛ, уочено је да везивање масних киселина узрокује отварање цепа у којем је смештен Cys-34.

Утицај везивања шест лекова (ибупрофена, диазепама, варфарина, рамиприла, бромазепама и диклофенака) испитан је обележавањем ХСА са 5-ДС и 16-ДС, при чему су резултати били слични онима добијеним за везивање масних киселина за ХСА. Везивање ибупрофена, бромазепама, рамиприла и диклофенака за 5-МСЛ/БСА је доводило до повећања флексибилности околине Cys-34, док су варфарин и диазепам испољавали супротан ефекат. Закључено је да су резултати добијени у оквиру ове дисертације у сагласности са бројем места везивања у албумину за сваки од ових лекова. Такође, није пронађена корелација између промена у ЕПР спектарима 5-ДС/ХСА, 16-ДС/ХСА и 5-МСЛ/БСА и места везивања лекова, што указује на то да структурне промене у албумину потичу на првом месту од оријентације лека и интеракција које успоставља са одређеним местом.

Две реактивне кисеоничне врсте, водоник-пероксид и супероксидни анјонски радикал, нису утицале на везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА, док су смањивале везивање 5-МСЛ и за Cys-34 и за аминок групе на БСА. Такође, ове две реактивне врсте су узроковале отварање Cys-34 цепа.

Уопштено, коришћењем сваког од три обележивача су успешно детектоване конформационе промене албумина. Међутим, ова једињења нису

показала подједнаку осетљивост за праћење конформационих промена. Стога се предлаже коришћење сва три обележивача, како би се добило што више информација о структурним променама у албумину са различитих места.

Кључне речи: албумин, ХСА, БСА, конформационе промене, спинско обележавање, ЕПР спектроскопија.

Научна област: Физичка хемија

Ужа научна област: Биофизичка хемија

Title of doctoral dissertation:

Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy in the study of albumin conformational changes by spin-labeling method

Abstract

Serum albumin is the most abundant blood plasma protein, which has been thoroughly studied using a plethora of techniques, due to its multiple important physiological roles. One of the methods used to monitor albumin conformational changes and binding capacity is electron paramagnetic resonance (EPR) spin-labeling methodology. For this purpose, albumin has been studied using various spin-labels, among which spin-labeled fatty acids have been the most commonly employed, since albumin is the main carrier of fatty acids. The other frequently used spin-label is 3-maleimido-proxyl (5-MSL) which binds covalently to the free cysteine residues.

In this doctoral dissertation, two spin-labeled stearic acids containing a paramagnetic doxyl group (the EPR-active group) attached at fifth (5-doxyl-stearic acid, 5-DS) and sixteenth (16-doxyl stearic acid, 16-DS) carbon atom of the methylene chain, were used to study the conformational changes of human serum albumin (HSA). Furthermore, conformational changes of bovine serum albumin (BSA) were studied by labeling BSA with 5-MSL. The conformational changes were induced by varying temperature and pH, addition of ethanol, binding several typical ligands (fatty acids and drugs) and exposure to strong oxidizing agents, hydrogen peroxide and superoxide anion radical. The additional goal of this dissertation was to reveal whether 5-MSL can be used to track subtle conformational changes arising from ligand binding, since 5-MSL is located in the fairly rigid environment when bound to the single free cysteine residue in BSA, located at the position 34 in amino acid sequence (Cys-34).

The results from this study show that the doxyl groups (group which reports the changes in its environment) of 5-DS and 16-DS, are located at different sites in HSA. Namely, doxyl group of 5-DS is located in the hydrophobic interior, while for 16-DS it is close to, or even protrudes the surface of HSA. Hence, these two compounds give information from the different locations in HSA molecule. It was also observed that EPR spectra of both DS spin-labels bound to HSA could be decomposed into components corresponding to the strongly (SB), weakly bound (WB) and unbound (UB)

label. In case of 5-MSL bound to BSA, it was shown that the corresponding EPR spectra consist of SB and WB component which originate from 5-MSL bound to Cys-34 and amino groups, respectively.

The conformational changes in both HSA and BSA were monitored by observing the width of the EPR spectra, $2A_{\max}$. Also, for 5-DS and 16-DS bound to HSA, the contributions of the three components (SB, WB and UB) to the total EPR spectrum were used to elucidate the effects of temperature, pH, ethanol, ligand binding and oxidative damage on HSA. On the other hand, for BSA labeled with 5-MSL, rotational correlation times for SB and WB components were additionally used to detect the induced changes. The results obtained by observing these parameters indicate that all three labels can successfully report the changes in HSA and BSA.

It was found that raising temperature induces enhanced flexibility of the doxyl group environment in the studied temperature range (25-75 °C) for 16-DS, while for 5-DS up to 50-55 °C doxyl group also exhibited increased mobility, most likely due to the albumin unfolding. However, at temperatures higher than 55 °C, it seems that the environment of 5-DS doxyl group became more rigid, which could be attributed to the protein aggregation. The analysis of the SB, WB and UB contributions revealed the redistribution of both 5-DS and 16-DS upon the increase in temperature, showing that the amount of SB decreases, while there is an increase of the WB and UB component. 5-MSL/BSA displayed similar behavior as 5-DS/HSA concerning the flexibility/rigidity of Cys-34 environment.

The changes of pH towards both acidic and basic conditions were detected by all three labels as an increase of the albumin's flexibility. As reported in the case of temperature induced changes, variations in pH also cause redistribution of 5-DS and 16-DS in HSA. Namely, at lower and higher pH than physiological, there is an increase in the amount of WB and UB label, compared to pH 7.4. Similar results were obtained for experiments in which the influence of rising ethanol concentrations was studied. The only difference compared to pH-related experiments was observed for 16-DS, whose $2A_{\max}$ values were increasing with ethanol concentration, which may be the consequence of either enhanced rigidity, or enhanced polarity in the 16-DS doxyl group environment, arising from the HSA unfolding.

Binding of five fatty acids (lauric, mirystic, palmitic, stearic and cis-oleic acid) caused redistribution of both 5-DS and 16-DS upon the binding of these labels to HSA, showing that the amount of WB and UB label increase with rising [fatty acid]:[HSA] molar ratios. Also, due to the alterations in binding of 5-DS and 16-DS to HSA in presence of fatty acids, the changes in the polarity/flexibility of 5-DS and 16-DS binding environments could be observed. Furthermore, by studying 5-MSL/BSA, it was found that binding of all fatty acids induces the opening of the Cys-34 crevice.

The results on the effect of drug binding (ibuprofen, diazepam, warfarin, ramipril, bromazepam and diclofenac), obtained by labeling HSA with 5-DS and 16-DS were similar to those reported for fatty acid binding to HSA. Binding of ibuprofen, bromazepam, ramipril and diclofenac to 5-MSL/BSA caused the Cys-34 environment to become more flexible, while warfarin and diazepam exhibit the opposite effect. It was concluded that the results obtained for drugs in this dissertation are in agreement with the number of binding sites in albumin for each drug. Also, the changes in the EPR spectra of 5-DS/HSA, 16-DS/HSA and 5-MSL/BSA could not be correlated with the binding site, implying that the structural changes in albumin depend primarily on the binding mode of drug to the certain site.

The two reactive oxygen species, hydrogen peroxide and superoxide anion radical, had no effect on the binding of 5-DS and 16-DS to HSA, while they caused the decrease in binding of 5-MSL to both Cys-34 and amino groups of BSA. Also, these two species induced the opening of Cys-34 crevice.

Generally, all three labels could be successfully used to monitor conformational changes of albumin, however, they did not show equal sensitivity to the induced alterations. Hence, it is suggested that all three labels should be used in order to obtain more information on the structural changes in albumin from the different sites.

Key words: albumin, HSA, BSA, conformational changes, spin-labeling, EPR spectroscopy.

Scientific field: Physical chemistry

Field of research: Biophysical chemistry

Скраћенице

10-ДС – 10-доксил-стеаринска киселина

12-ДС – 12-доксил-стеаринска киселина

16-ДС – 16-доксил-стераинска киселина

5-ДС – 5-доксил-стеаринска киселина

5-МСЛ – 3-малеимидо проксил (од енглеског *5-maleimido spin label*)

БСА – говеђи серумски албумин (од енглеског *Bovine Serum Albumin*)

Cys – цистеин

Cys-34 – цистеин који се и у говеђем и хуманом серумском албумину налази на позицији 34 у аминокиселинској секвенцији

ДЕЕР – Дупла електрон-електрон резонанција (од енглеског *Double Electron-Electron Resonance*)

ЕПР – Електронска парамагнетна резонанција

ЈВ – јако везани обележивач

МА – модулациона амплитуда

МВЛ1 и МВЛ 2 – места везивања лекова 1 и 2 у говеђем и хуманом серумском албумину

Met – метионин

МК – масна киселина

МК1-МК9 и МК2' – места везивања масних киселина означена бројевима 1-9 и 2'

НВ – невезани обележивач

ПБС – фосфатни пуфер са 0,9 % NaCl (од енглеског *Phosphate Buffered Saline*)

РОС – реактивне кисеоничне врсте (од енглеског *Reactive Oxygen Species*)

СА – серумски албумин

СВ – слабо везани обележивач

ТРИС – трис-хидроксиметиламинометан

Trp-135 – триптофан који се у говеђем серумском албумину налази на позицији 135 у аминокиселинској секвенцији

Trp-214 – триптофан који се и у говеђем и хуманом серумском албумину налази на позицији 214 у аминокиселинској секвенцији

Tyr-84 – тирозин који се и у говеђем и хуманом серумском албумину налази на позицији 84 у аминокиселинској секвенцији

ХСА – хумани серумски албумин

Садржај

1.	Увод.....	1
1.1.	Предмет и циљ дисертације.....	2
2.	Преглед литературе.....	5
2.1.	Серумски албумин.....	5
2.1.1.	Структура серумског албумина.....	5
2.1.2.	Функције серумског албумина	10
2.1.2.1.	<i>Места везивања лиганада за албумин</i>	<i>13</i>
2.1.2.1.1.	<i>Места везивања лекова</i>	<i>14</i>
2.1.2.1.2.	<i>Места везивања масних киселина</i>	<i>16</i>
2.2.	Електронска парамагнетна резонанција.....	20
2.2.1.	Општа теорија електронске парамагнетне резонанције.....	20
2.2.2.	Хиперфина интеракција у изотропним системима.....	22
2.2.3.	Параметри и облик ЕПР спектра.....	24
2.2.3.1.	<i>Анизоторпија хиперфине интеракције (А-анизоторпија)</i>	<i>29</i>
2.2.3.2.	<i>Енергијска анизоторпија (g-анизоторпија)</i>	<i>31</i>
2.2.3.3.	<i>Утицај модулационе амплитуде на ЕПР спектар</i>	<i>33</i>
2.2.3.4.	<i>Утицај снаге микроталасног зрачења на ЕПР спектар</i>	<i>33</i>
2.3.	Спинско обележавање протеина	34
2.3.1.	Спинско обележавање хуманог и говеђег серумског албумина.....	38
3.	Материјали и методе.....	42
3.1.	Хемикалије	42
3.2.	Припрема узорака хуманог серумског албумина и обележавање доксил-стеаринским обележивачима	42
3.2.1.	Оптимизација времена и температуре инкубације ХСА и ДС	43
3.2.2.	Компетиција између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА.....	43
3.2.3.	Испитивање изложености доксил групе води.....	44
3.2.4.	Испитивање утицаја температуре на конформацију ХСА.....	44
3.2.5.	Испитивање утицаја рН на конформацију ХСА	45
3.2.6.	Испитивање утицаја етанола на конформацију ХСА.....	46
3.2.7.	Испитивање утицаја везивања лиганада за ХСА	46
3.2.8.	Испитивање утицаја реактивних кисеоничних врста на ХСА	47

3.3. Припрема узорака говеђег серумског албумина и обележавање 3-малеимидо-проксилом.....	47
3.4. Мерења на ЕПР спектрометру.....	49
3.5. Симулације ЕПР спектра	50
4. Резултати и дискусија.....	52
4.1. Везивање доксил-стеаринских обележивача за хумани серумски албумин.....	52
4.1.1. Оптимизација инкубационих услова за везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА	55
4.1.2. Утицај моларног односа [ДС]:[ХСА] на везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА	56
4.1.3. Компетиција између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА.....	61
4.1.4. Кинетика редукције 5-ДС и 16-ДС аскорбинском киселином	65
4.2. Везивање 3-малеимидо проксила за говеђи серумски албумин	68
4.3. Испитивање конформационих промена у хуманом и говеђем серумском албумину.....	71
4.3.1. Утицај температуре на конформацију ХСА и БСА.....	71
4.3.1.1. Утицај температуре на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача.....	71
4.3.1.1.1. Утицај температуре на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА.....	73
4.3.1.2. Утицај температуре на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача.....	75
4.3.2. Утицај рН на конформацију ХСА и БСА	78
4.3.2.1. Утицај рН на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача.....	78
4.3.2.1.1. Утицај рН на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА.....	82
4.3.2.2. Утицај рН на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача.....	84
4.3.3. Утицај етанола на конформацију ХСА и БСА.....	85
4.3.3.1. Утицај етанола на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача	85
4.3.3.1.1. Утицај етанола на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА.....	87
4.3.3.2. Утицај етанола на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача	88
4.3.4. Утицај везивања масних киселина на конформацију ХСА и БСА	90

4.3.4.1.	Утицај везивања масних киселина на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача	90
4.3.4.1.1.	Утицај везивања масних киселина на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА	92
4.3.4.2.	Утицај везивања масних киселина на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача	94
4.3.5.	Утицај везивања лекова на конформацију ХСА и БСА	96
4.3.5.1.	Утицај везивања лекова на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача	96
4.3.5.1.1.	Утицај везивања лекова на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА	98
4.3.5.2.	Утицај везивања лекова на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача	101
4.3.6.	Утицај реактивних кисеоничних врста на конформацију ХСА и БСА	103
4.3.6.1.	Утицај реактивних кисеоничних врста на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача	103
4.3.6.2.	Утицај реактивних кисеоничних врста на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача	105
5.	Закључак	107
6.	Литература	111
	Биографија.....	128
	Научни радови у којима су публиковани резултати из докторске дисертације....	129
	Изјава о ауторству	130
	Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада	131
	Изјава о коришћењу	132

1. Увод

Серумски албумин (СА) је глобуларни протеин молекулске масе од око 66000 Da, који се синтетише у јетри кичмењака одакле се излучује у крвоток, где чини 60 % укупног протеинског садржаја плазме [1–3]. Ови протеини имају неколико важних функција у физиолошким условима међу којима је најважнији транспорт многобројних ендогених и егзогених супстанција мале молекулске масе, као што су неестерификоване масне киселине, лекови, хормони, стероиди, азот моноксид (NO), метални јони итд [2–5]. Осим што има транспортну улогу, албумин чини око 80 % укупног антиоксидативног капацитета крви, захваљујући цистеину на позицији 34 (Cys-34), који не гради дисулфидне мостове, тако да је његова сулфхидрилна група подложна оксидацији до сулфенског, сулфинског или сулфонског облика [6,7]. Додатни значај Cys-34 огледа се у томе што може да реагује са азот-моноксидом (важним сигналним молекулом), тако да СА има важну улогу и у сигналним путевима и вазодилатацији [3]. Такође, СА чини око 80 % колоидног осмотског притиска [8], а има улогу и у одржавању рН вредности крви [3].

Због овако великог значаја албумина, он је један од највише изучаваних протеина. За испитивање његове структуре, конформационих промена и интеракција са различитим супстанцијама коришћено је обиље разних техника, као нпр. флуоресцентна, Раманска, инфрацрвена, нуклеарна магнетна резонантна спектроскопија, рендгено-структурна анализа, циркуларни дихроизам итд [9–16]. Једна од техника која је, такође, коришћена за испитивање албумина је електронска парамагнетна резонантна спектроскопија (ЕПР). Како би албумин могао да се испитује помоћу ЕПР-а, за њега се најпре везује парамагненти молекул (спински обележивач или проба¹) који садржи неспарен електрон, чији се сигнал детектује помоћу ЕПР-а. Спински обележивачи су осетљиви на поларност, протичност и вискозност средине, као и на смањену покретљивост, што се све манифестује у изгледу ЕПР спектра. Имобилизација обележивача доводи до асиметричног ширења ЕПР спектра, стога мерењем одређених параметара спектра, може да се детектује конформациона промена албумина [17,18].

¹ Даље ће у тексту бити коришћен само термин обележивач ради једноставности.

С обзиром на транспортну функцију албумина углавном су за спинско обележавање хуманог (ХСА, од енглеског *Human Serum Albumin*) и говеђег серумског албумина (БСА, од енглеског *Bovine Serum Albumin*) коришћени деривати масних киселина и то претежно стеаринске киселине; код ових масних киселина је парамагнетна доксил група ковалентно везана за неки од угљеникових атома у метиленском низу [9,11,12,19–43]. Међу њима су најчешће коришћене две доксил-стеаринске киселине код којих се доксил група налази на супротним крајевима метиленског ланца – 5-доксил-стеаринска киселина (5-ДС) и 16-доксил-стеаринска киселина (16-ДС). У литератури постоји велики број радова у којима је 16-ДС коришћен за обележавање крвних серума или плазми (при чему би 16-ДС требало да се у највећој мери везује за ХСА) здравих контрола и пацијената оболелих од различитих болести [44–51]. У овим студијама је детектована промена у количини невезаног (НВ), јако (ЈВ) и слабо везаног (СВ) 16-ДС обележивача код пацијената у односу на здраве контроле, тако да је утврђено да везивање 16-ДС за ХСА у плазми/серуму има дијагностички потенцијал.

Иако доксил-стеарински обележивачи дају корисне информације које се тичу конформационих промена албумина и последично измењеног капацитета за везивање лиганада, проблем представља што албумин може да веже до седам дуголанчаних масних киселина [52,53], тако да се ове информације добијају истовремено са више различитих места. Да би се добиле информације само са једног места, албумин је уобичајено обележаван ковалентним везивањем 3-малеимидо-проксила (5-МСЛ) за Cys-34 [54–60]. Међутим, у неким радовима је наведено да је овај обележивач сувише ригидно везан за Cys-34, тако да није довољно осетљив за детекцију вредности рН на којима се догађају кисело-базни прелази у експериментима у којима се варира рН [54,55].

1.1. Предмет и циљ дисертације

У овој дисертацији проучаване су конформационе промене ХСА и БСА методом ЕПР спинског обележавања, при чему су за испитивање ХСА коришћени 5-ДС и 16-ДС, док је БСА обележаван са 5-МСЛ. Главни циљ је био да се испитају промене конформације ХСА и БСА услед варирања температуре, рН, додатка

етанола, везивања лиганада (масних киселина и лекова) и дејства реактивних кисеоничних врста.

Како би се успешно пратиле конформационе промене ХСА, најпре је детаљно испитано везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА. На првом месту су утврђени оптимални услови (инкубационо време и температура) за достизање максималног везивања 5-ДС и 16-ДС за ХСА. Урађене су рачунарске симулације како би се одредило у којој мери се ова два обележивача везују за два различита типа места на ХСА – места јаког и слабог везивања. Да би се одредило да ли се 5-ДС и 16-ДС везују за иста места на ХСА урађени су и експерименти конкуренције у којима су ова два обележивача истовремено везивана за ХСА. На крају, испитана је и позиција доксил групе ДС обележивача (изложеност растварачу, тј. колико се дубоко налази у унутрашњости ХСА), праћењем и анализом кинетике редукције доксил група 5-ДС и 16-ДС (везаних за ХСА) аскорбинском киселином².

У овој дисертацији је, такође, приказана детаљна анализа ЕПР спектра 5-МСЛ/БСА конјугата, како би било утврђено да ли се овај обележивач осим за Cys-34 везује и за аминокиселинске групе, с обзиром на то да на ову тему постоје опречне хипотезе у литератури [57,61].

У главном делу ове дисертације приказано је како температура и рН утичу на конформационе промене ХСА и БСА, што је посебно важно да би се испитала осетљивост 5-МСЛ за детекцију конформационих промена индукованих варирањем рН, пошто су подаци у литератури на ову тему непотпуни [54,55].

При испитивању интеракција између хидрофобних супстанција и албумина, често се користи етанол као растварач за припрему узорка, што је забележено и за случај када се обележавање крвног серума/плазме са 16-ДС користи за дијагностику [44–51]. Из тог разлога је испитано како етанол утиче на конформацију ХСА и БСА. Од посебног значаја је проучавање утицаја присуства етанола на уделе јако (ЈВ), слабо везане (СВ) и невезане (НВ) компоненте у ЕПР спектрима 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса.

Познато је да се у физиолошким условима, у просеку 0,1-2 мола масних киселина везује за 1 мол албумина, а при неким патолошким стањима, као што су

² Аскорбинска киселина, као хидрофилан молекул тешко продире у хидрофобну средину, тако да ће брже редукovati доксил групе ближе површини албумина.

дијабетес, болести јетре и кардиоваскуларног система, за један молекул албумина може да буде везано чак до 6 молекула масних киселина [3,62,63]. Због тога је испитано како различите концентрације масних киселина претходно везаних за албумин утичу на његову конформацију и последично на капацитет везивања. Уколико већи број масних киселина везаних за албумин у поменутим патолошким стањима утиче на везивање доксил-стеаринских обележивача за ХСА, промене у везивању 5-ДС и 16-ДС за ХСА би могле да се користе за дистинкцију између контрола и пацијената оболелих од наведених болести. У оквиру овог дела дисертације додатно је испитана применљивост 5-МСЛ обележивача за детекцију суптилних конформационих промена насталих услед везивања масних киселина.

Везивање лекова за ХСА који су део свакодневне терапије би, такође, могло да утиче на промене у количини ЈВ, СВ и НВ компоненте 5-ДС и 16-ДС, што би представљало проблем при коришћењу ових обележивача у дијагностичке сврхе. Осим тога, проучавање интеракција између лекова и албумина је важно за боље разумевање фармакокинетики и фармакодинамики. Зато је један део ове дисертације посвећен испитивању утицаја везивања лекова на конформацију и капацитет везивања ХСА и БСА.

На крају, показано је како две реактивне кисеоничне врсте, водоник пероксид и супероксидни анјонски радикал, утичу на конформацију и капацитет везивања албумина. Испитивањима урађеним у оквиру ове докторске дисертације омогућава се боље разумевање оксидативних оштећења албумина, која могу да настану као последица разних патолошких стања која су уско повезана са оксидативним стресом [64].

2. Преглед литературе

2.1. Серумски албумин

Серумски албумин (СА) је протеин који се синтетише искључиво у јетри кичмењака, одакле се излучује у крвоток (без претходног складиштења, што значи да организам не поседује резерве албумина [1,2]); у крви овај протеин чини више од 60 % укупних протеина крвне плазме [8]. У физиолошким условима, само 20-30 % хепатоцита синтетише дневно 9-12 g албумина [1,65], чиме је омогућено да се производња албумина увећа неколико пута, уколико је то потребно [2,65]. С обзиром на то да је време полуживота албумина у крвотоку релативно дуго (око 19 дана [66], а може да се задржи у крвотоку и до 36 дана [2]), албумин је веома стабилан протеин [6], због чега у крви сисара достиже високу концентрацију која се креће у опсегу 35-55 g l⁻¹ [66]. Албумин, такође, може да из крви прође кроз зидове капилара у интерстицијалне течности, укључујући и цереброспиналну течност, одакле се преко лимфног система враћа у крв [2,3]. Катаболизам албумина још увек није довољно испитан, али се сматра да се процес разградње албумина одвија у свим ткивима, а у највећој мери у кожи, мишићима и јетри [67].

2.1.1. Структура серумског албумина

Серумски албумини сисара су релативно мали, неконјуговани, глобуларни протеини молекулске масе од око 66000 Да [3], који садрже око 580 аминокиселина у својој примарној структури [66]. Две највише проучаване врсте албумина, из хуманог (ХСА, од енглеског *Human Serum Albumin*) и говеђег серума (БСА, од енглеског *Bovine Serum Albumin*) се састоје из 585 и 583 аминокиселине, респективно [3,66]. Уопштено, поређењем серумских албумина различитих сисара, утврђено је да постоји преклапање у 60-80 % аминокиселинских секвенција [66,68,69]. У случају ХСА и БСА, преклапање у аминокиселинским секвенцијама износи 75,6 % [69].

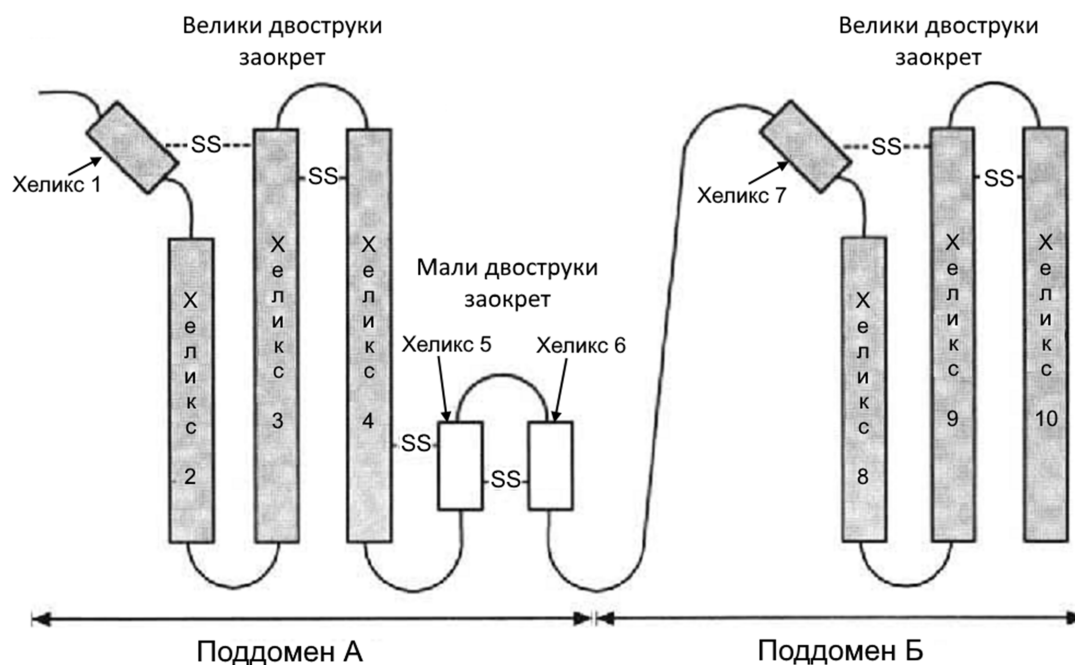
У оквиру аминокиселинске секвенције СА најмањи је садржај триптофана (Тгр), метионина, глицина и изолеуцина [2,3]. У ХСА постоји само један Тгр на

позицији 214 (Trp-214), чије гашење флуоресценције се често прати при испитивању конформационих промена албумина и интеракција са лигандима [2,3,9,66]. За разлику од ХСА, БСА има још један Trp на позицији 135 (Trp-135), што је, такође, значајно при спектрофлуориметријским испитивањима албумина [9,66].

Примарна структура СА се у највећој мери састоји од аминокиселина са наелектрисаним бочним групама, као што су нпр. аспарагинска и глутаминска киселина, лизин и аргинин [9]. Из тог разлога, на рН 7,0 ХСА има велики број јонизованих група (укупно 215 позитивно и негативно наелектрисаних јона), што га чини лако растворљивим у води [2]. Како и ХСА и БСА имају више киселих аминокиселина у односу на базне, ове две врсте СА су при рН 7,0 негативно наелектрисане [2,3,70]. Укупно наелектрисање на рН 7,0 за ХСА износи -15 [2], а за БСА -17 [70]. Из истог разлога, ове две врсте СА имају изоелектричне тачке (pI) у благо киселој средини – ХСА има вредност pI у опсегу 5,0-5,8 у зависности од литературног извора [3,71,72], док за БСА pI износи 4,7-4,9 [73].

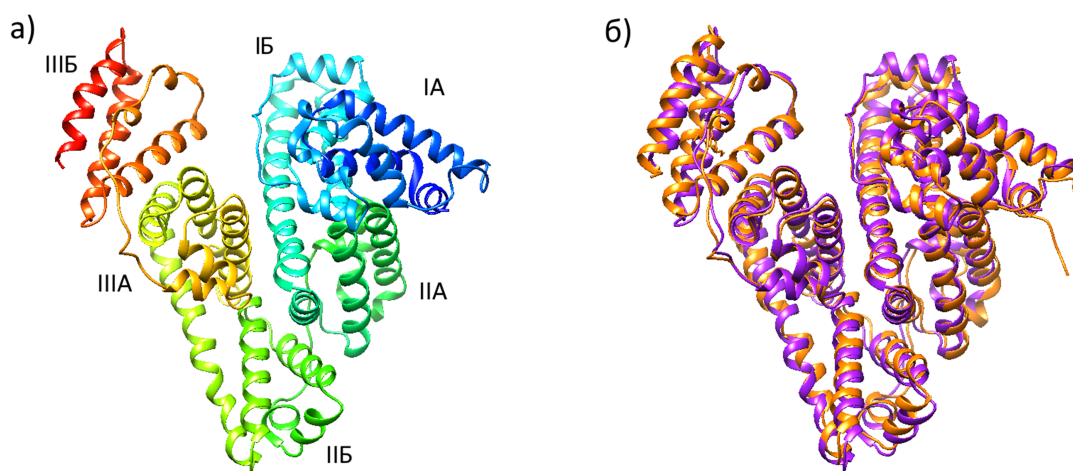
СА су богати цистеином (Cys), па тако СА сисара у својој примарној структури садрже 35 Cys, од којих 34 учествује у формирању 17 дисулфидних мостова, а само један Cys на позицији 34 (Cys-34) је неспарен и поседује слободну сулфхидрилну (-SH) групу [3,9], која има важне физиолошке функције о којима ће бити више речи у поглављу 2.1.2. Дисулфидни мостови у великој мери доприносе стабилности СА и учествују у формирању 9 (прецизније 8,5) двоструких заокрета. Као што се види на примеру БСА (слика 1), двоструки заокрети настају тако што два суседна Cys граде дисулфидне мостове са претходним, односно првим следећим најближим Cys остатком [3]. Двоструки заокрети су груписани у три домена (који се обележавају римским бројевима I, II и III, почевши од N-терминуса), која су хомолога по аминокиселинској секвенцији, секундарној и терцијарној структури [2,3,66]. Сваки од домена садржи по два дужа заокрета између којих се налази један краћи. Прва два заокрета у сваком домену, 1-2, 4-5 и 7-8, груписана су у поддомене IA, IIA и IIIA, редом, док заокрети 3, 6 и 9 улазе у састав поддомена IB, IIB и IIIB (слика 1) [3].

Рендгено-структурном анализом ХСА и БСА утврђено је да у њиховој секундарној структури не постоје β -плоче, већ само α -хеликси који чине око 67 % структуре албумина [3,66,74], док је остатак сачињен од заокрета и несавијених (исправљених) полипептидних делова [68,74]. У сваком од три домена ова два протеина налази се по 10 α -хеликса, од чега се 6 налази у поддомену А, а 4 у поддомену Б [2,3]. Поддомени IA, ПА и ША су међусобно хомологе структуре, што важи и за поддомене IB, IB и ШБ. Ипак, постоји мала разлика у структури поддомена IA у поређењу са ПА и ША. Наиме, у поддомену IA не постоји дисулфидни мост који повезује први и трећи хеликс [68]. Организација хеликса и двоструких заокрета у поддомене приказана је на слици 2.



Слика 2. Схематски приказ структуре домена у албумину. Делови осенчени сивом бојом представљају мотиве који су заједнички за свих шест поддомена. Овај мотив је окарактерисан кратким хеликсом (у случају поддомена IA) или кратким делом исправљеног полипептидног ланца на који се наставља кратак хеликс (у случају поддомена ПА и ША), а затим следе три узастопна дуга, међусобно антипаралелна хеликса, при чему су суседни хеликси повезани дисулфидним мостовима. Почетни део сваког поддомена представља велики двоструки заокрет (осим заокрета 1 који је једноструки у поддомену IA). У сваком од три А-поддомена, велики двоструки заокрет је праћен мањим. (Прилагођено из [68].)

Веза између А и Б поддомена у оквиру истог домена је у N-терминалном делу несавијени полипептид, док се на граници између домена C-терминални део хеликса из IB и IIB поддомена наставља у N-терминалне хеликсе поддомена IIA и IIIA [68]. Поддомен PA је хидрофобним интеракцијама и водоничним везама повезан са додирном површином између поддомена IA и IB, захваљујући чему су домени I и II скоро међусобно нормални и тако су организовани да формирају структуру у облику слова „Т“. Домен III интерагује само са поддоменом IIB, тако да домени II и III заједно чине једну целину у облику слова „У“. Домени I и III су раздвојени великим каналом између поддомена IB, IIIA и IIIB. Због различитих оријентација између домена и последично њихових интеракција, структура албумина је асиметрична, а домени су организовани тако да албумин има облик срца чије су димензије 80 x 80 x 30 Å (слика 3а) [2,74]. Кристалографска испитивања ХСА, БСА, као и СА других сисара су показала да су њихове терцијарне структуре хомологе [66,69], а на слици 3б су приказане преклопљене структуре ХСА и БСА.



Слика 3. а) Приказ кристалне структуре ХСА са обележеним поддоменима (Прилагођено из [74], преузето са сајта <https://www.rcsb.org/> PDB ID: 1a06). **б)** Приказ преклопљених кристалних структура ХСА (обојено у љубичасто, прилагођено из [74], преузето са сајта <https://www.rcsb.org/> PDB ID: 1a06) и БСА (обојено у наранџасто, прилагођено из [66], преузето са сајта <https://www.rcsb.org/> PDB ID: 4f5s). Кристалне структуре су визуелизоване помоћу програма *UCSF Chimera 1.11.2* [75].

Због присуства великог броја киселих и базних аминокиселина у својој структури, албумин подлеже реверзибилним конформационим променама на

различитим рН вредностима. На рН између 4,5 и 8,0, ХСА и БСА се налазе у тзв. неутралној, **Н**-форми [2,3,76]. Смањивањем рН на вредност мању од 4,5, ХСА и БСА мењају своју конформацију у брзо мигрирајућу **Ф**-форму (од енглеског *Fast*, пошто је ова форма уочена као брзо мигрирајућа на рН 3-4 при гел електрофорези [3]), коју карактерише повећана вискозност и много нижа растворљивост у односу на базну, **Б**-форму (од енглеског *Basic*), као и нарушавање секундарне структуре (губљење α -хеликса). **Ф**-форма је постојана у опсегу рН између 3,5 и 4,5 [2,76,77]. Даљим смањењем рН испод 3,5, долази до додатног разматавања албумина услед чега он прелази у **Е**-форму (од енглеског *Extended*). На рН око 2,5 албумин се налази у максимално размотаној (исправљеној) конформацији, у мери у којој то дозвољава постојећи образац дисулфидних мостова [77]. Са друге стране, повећањем рН, већ у благо алкалним условима у опсегу између рН 7,0 и 9,0 дешава се још један рН-прелаз у **Б**-форму. Прелаз из **Н**- у **Б**-форму је суптилнији и постепенији у односу на трансформације које се догађају у киселој средини, а праћен је повећањем флексибилности структуре албумина, при чему је **Н**-терминус највише изложен утицају ових структурних промена [77]. Повећањем рН вредности изнад 9,0 (или смањењем јонске јачине раствора) догађа се још један прелаз, при чему настаје тзв. **А**-форма албумина (од енглеског *Aged*). У току изомеризације у алкалној средини слободна $-SH$ група Cys-34 прелази у дисосовани облик $-S^-$ који катализује реакцију измене дисулфидних мостова, и то тако да слободна $-SH$ група на крају процеса буде на свом почетном положају (тј. на Cys-34) [3,78]. Овај процес је иреверзибилан. Једном кад настане, **А**-форма је веома стабилна и постојана чак и при нижим рН вредностима. За разлику од **Н**-форме, када се рН смањује до око 4,5 **А**-форма није подложна прелазу у **Ф**-форму [3,79].

2.1.2. Функције серумског албумина

Серумски албумин има неколико веома важних физиолошких функција, па је због тога детаљно проучаван. Захваљујући својој високој концентрацији у крви, албумин даје највећи допринос укупном колоидном осмотском (онкотском) притиску плазме, у којем учествује са око 80 % [8]. Последица патолошких стања

у којима је интраваскуларна концентрација албумина значајно нижа од физиолошке (хипоалбуминемија) јесте смањење волумена крви, услед смањеног онкотског притиска и последичног проласка течности (воде) из интраваскуларног у интерстицијални простор. При томе је могуће настајање периферних едема (отока), због тога што се течност акумулира у интерстицијалном простору [67]. Допринос албумина онкотском притиску је чак већи од очекиваног, због постојања Гибс-Донанове (Gibbs-Donnan) равнотеже, тј. разлика у концентрацији великих наелектрисаних макромолекула (као што је албумин) са различитих страна полупропустљиве мембране спречава дифузију малих јона кроз дату мембрану, иако је она пропустљива за ове јоне [3,67,80]. Пошто је албумин негативно наелектрисан при физиолошкој вредности рН, он за себе везује мале катјоне из крви, и то највише Na^+ , који „задржава“ воду [6]. Захваљујући својој растворљивости у води, наелектрису и томе што је присутан у великим количинама и у екстраваскуларном простору, албумин има значајну улогу и у регулацији концентрације течности у различитим ткивима [80].

Осим наведених функција, због своје велике заступљености у крви и јединственог аминокиселинског састава, албумин има утицај и на киселинско-базну физиологију. Како у својој примарној секвенцији садржи око 15 хистидинских остатака [3], од којих сваки има вредност константе дисоцијације pK_a око 7,4, албумин може да функционише и као крвни пуфер. Међутим, међу протеинима крви, хемоглобин има већи пуферски капацитет у поређењу са албумином [80]. На рН крви највише утичу парцијални притисак CO_2 , концентрација различитих јона јаких (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Cl^-) и слабих (фосфат, хидрогенкарбонат) електролита, као и осталих једињења која се понашају као слабе киселине или базе [80,81]. Однос концентрација катјона и анјона у крви одређује колика ће бити концентрација H^+ јона (тј. рН крви), тиме што ће се концентрација H^+ јона мењати тако да буде постигнута електронеутралност [81]. Према томе, пошто сваки молекул албумина у физиолошким условима располаже релативно великим негативним наелектрису, значајне промене у концентрацији албумина утичу на однос концентрација катјона и анјона у крви, а самим тим и на промене рН [80].

Око 80 % антиоксидативног капацитета крви се приписује албумину захваљујући израженој редокс активности Cys-34, који у физиолошким условима постоји углавном у свом редукованом облику (овакав албумин је познат и под називом меркаптоалбумин) [6], а осим њега анитоксидативна својства показују и метионински остаци (Met) [82]. Сулфхидрилна група Cys-34 може да се оксидује до сулфенског облика (албумин-SOH) у реакцији са водоник пероксидом H_2O_2 или пероксинитритом ($ONOO^-$) [7], или чак и до виших оксидационих стања – сулфинског (албумин-SO₂H) или сулфонског (албумин-SO₃H) облика [6]. Сулфенски облик је најчешћи производ оксидације и за разлику од сулфинског и сулфонског веома је нестабилан и реактиван, тако да само овај облик у реакцији са неким другим сулфхидрилним једињењем може да формира дисулфиде који потенцијално редокс реакцијама могу да се преведу назад у меркаптоалбумин [6,7]. Оксидацијом метионина настаје метионин-сулфоксид који, као и Cys-34 благим сулфхидрилним редуктансима може да се врати у почетни, метионински, облик, док само у екстремним оксидативним условима, какви обично нису заступљени у биолошким системима, долази до иреверзибилног стварања сулфона [82]. Мала фракција албумина, такође, може да формира дисулфидна једињења (албумин-S-S-R) са другим молекулима који садрже сулфхидрилне групе. Најчешће гради конјугате са глутатионом, хомоцистеином и цистеином, при чему је везивање хомоцистеина за албумин значајно за посредну антиоксидативну активност албумина. Наиме, студије показују да повишене концентрације слободног хомоцистеина стимулишу проинфламаторне путеве у васкуларним ћелијама, што за последицу има оксидативни стрес [83]. Везивањем хомоцистеина за албумин онемогућава се да отпочне каскада процеса која доводи до оксидативног стреса [82]. Количина дисулфидних конјугата временом расте, што је део процеса старења, а такође може бити и последица патолошких стања која су окарактерисана оксидативним стресом. Теоријски је могућ и настанак димера који се формирају између два молекула албумина, грађењем дисулфидног моста између њихових слободних Cys-34 остатака, међутим вероватноћа за димеризацију *in vivo* је веома мала због постојања стерних сметњи [6]. Осим тога, Cys-34 има значајну улогу и у сигналним путевима, због тога што у реакцији S-нитрозилације може да веже азот-моноксид (NO), веома важан вазодилататорски

молекула [3]. *In vivo* S-нитрозиловани албумин представља стабилни резервоар за NO, који може да се отпусти, тако да се S-нитрозиловани албумин понаша као донор NO [2,3].

Једна од најважнијих физиолошких функција албумина јесте везивање и транспорт многобројних ендогених и екзогених супстанција мале молекулске масе. Тако на пример, албумин за себе везује и преноси неестерификоване масне киселине, стероиде, хормоне (нпр. тироксин), хем, билирубин, лекове, витамине, флавоноиде, азот-моноксид (NO), токсине и метаболите, металне јоне итд [2–5]. Такође може да везује и полипептиде и мање протеине [2,3]. С обзиром на то да су наведена једињења углавном хидрофобна, везивањем за албумин се повећава њихова растворљивост у плазми и, у случају терапеутика, омогућава да се они дуже задржавају у организму, због чега и имају већу терапеутску ефикасност. Из тог разлога, познавање интеракције лекова са албумином је веома важно ради добијања информација о фармакодинамици и фармакокинетици. Осим тога, везивањем појединих токсина за албумин смањује се њихова токсичност. Кроз везивање појединих металних јона, албумин испољава и своју посредну антиоксидативну улогу. Метални јони Cu^+ и Fe^{2+} реагују са H_2O_2 у Фентоновој реакцији дајући као главни производ реакције веома реактиван и штетан $\cdot\text{OH}$ радикал. Везивањем ових јона за албумин ће бити смањена њихова способност да учествују у Фентоновој реакцији. Уколико јони бакра и гвожђа везани за албумин успеју да произведу мању количину $\cdot\text{OH}$ радикала, настали радикали ће у највећој мери изреаговати са албумином, чиме ће се умањити могућност оштећења других важнијих молекула [82].

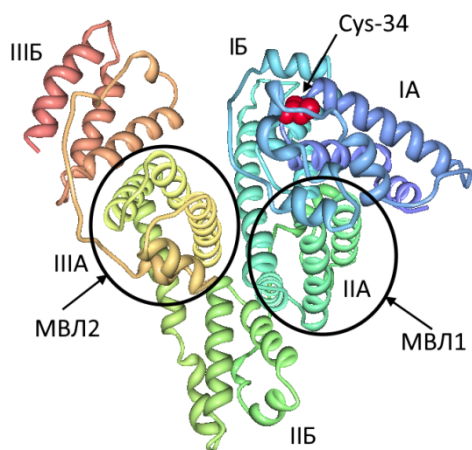
2.1.2.1. Места везивања лиганата за албумин

За већину лиганата је пронађено и описано неколико места везивања. Један молекул албумина може да веже седам молекула неестерификованих средње- и дуголанчаних молекула масних киселина (МК) на места везивања означена као МК1-МК7 [52,66]. Осим наведених места, пронађена су још четири додатна за МК средње дужине ланца [52]. Три места везивања за МК се преклапају са два главна места везивања лекова (МВЛ1 и МВЛ2). Наиме, МК3 и МК4 се преклапају са

МВЛ2, а МК7 са МВЛ1 [2,4]. За везивање метала су идентификована четири различита места: N-терминус, два места за везивање кадмијума (место А и место Б) и Cys-34 [84]. У следећем поглављу биће дат детаљнији опис места везивања лекова и масних киселина у албумину, с обзиром на то да је у овој дисертацији проучавно везивање пет масних киселина и шест уобичајено коришћених лекова за албумин. Међутим, на овом месту треба нагласити да су подаци о овим местима добијени структурним (и то углавном кристалографским) испитивањима комплекса ХСА са разним лигандима или металним јонима, док за БСА такви подаци још увек нису доступни у литератури. Тачније, тек пре неколико година (2012) су урађена прва кристалографска испитивања чистог БСА (који није био у комплексима са другим супстанцијама) и упоређена са структуром ХСА [66,69]. Наредних година је објављено неколико радова који се баве проучавањем кристалографских структура БСА и СА још неколико сисара у комплексима са неколико лекова, који не представљају типичне лиганде за СА [85–87]. У овим студијама је показана хомологија у терцијарним структурама ХСА и БСА и откривено је да постоје велика поклапања у аминокиселинском саставу ХСА и БСА на локацијама где су за ХСА идентификована главна места везивања. На основу таквих резултата претпоставља се да су позиције и број места везивања у БСА сличне као у ХСА [66].

2.1.2.1.1. Места везивања лекова

Средином 1970-их година, откривено је да се велики број лекова везује за једно од два главна места на албумину - МВЛ1 и МВЛ2 [88,89]. Захваљујући даљим кристалографским испитивањима ХСА ван комплекса [8,68,74,90,91] и у комплексима са лековима [92–94] добијене су детаљне информације о геометрији ова два везујућа места, као и о томе које су аминокиселине најважније за остваривање интеракција са лековима. На слици 4 је приказана кристална структура ХСА на којој су назначена МВЛ1 и МВЛ2.



Слика 4. Приказ кристалне структуре ХСА са назначеним главним местима везивања лекова – МВЛ1 и МВЛ2. Cys-34, за који могу да се ковалентно везују поједини лекови је приказан црвеним сферама. Структура је преузета са сајта <https://www.rcsb.org/> PDB ID: 1ao6 [74] и визуелизована у програму *RCSB Protein Workshop* [95,96]. Места везивања су означена на основу референце [94].

а) МВЛ1

Ово место се налази у поддомену IIA, при чему захвата свих шест хеликса који припадају овом поддомену, и додатно један хеликс и заокрет из поддомена IB. У оквиру МВЛ1 налази се Trp-214 [2,97]. Унутрашњост овог места је највећим делом сачињена од хидрофобних бочних остатака аминокиселина, али такође постоје и два кластера поларних аминокиселинских остатака. Један поларни регион се налази дубоко у унутрашњости МВЛ1 (чине га предоминантно базне групе), а други се налази при површини и чине га позитивно наелектрисане групе [74,94]. МВЛ1 се састоји из централног региона из којег се издвајају три мања одељка [94]. Постоје назнаке да је МВЛ1 веома флексибилно место, с обзиром на то да је утврђено да два или више различитих молекула могу да се истовремено вежу [97]. Типични лиганди за МВЛ1 су велики хетероциклични молекули, чије је негативно наелектрисање локализовано на средини молекула, или чак једињења која садрже две анјонске или електронегативне функционалне групе на супротним крајевима, које могу да интерагују са оба позитивно наелектрисана кластера [94]. Као пример лека који се везује за ово место на албумину може се навести антикоагуланс варфарин [94].

б) МВЛ2

Кристаллографским студијама је утврђено да је место на албумину, МВЛ2, изграђено из свих 6 хеликса који припадају поддомену IIIA, тако да је тополошки веома слично са МВЛ1. МВЛ2 је као и МВЛ1 хидрофобно место, у којем се издваја један поларни региони. Међутим, између МВЛ1 и МВЛ2 постоје значајне

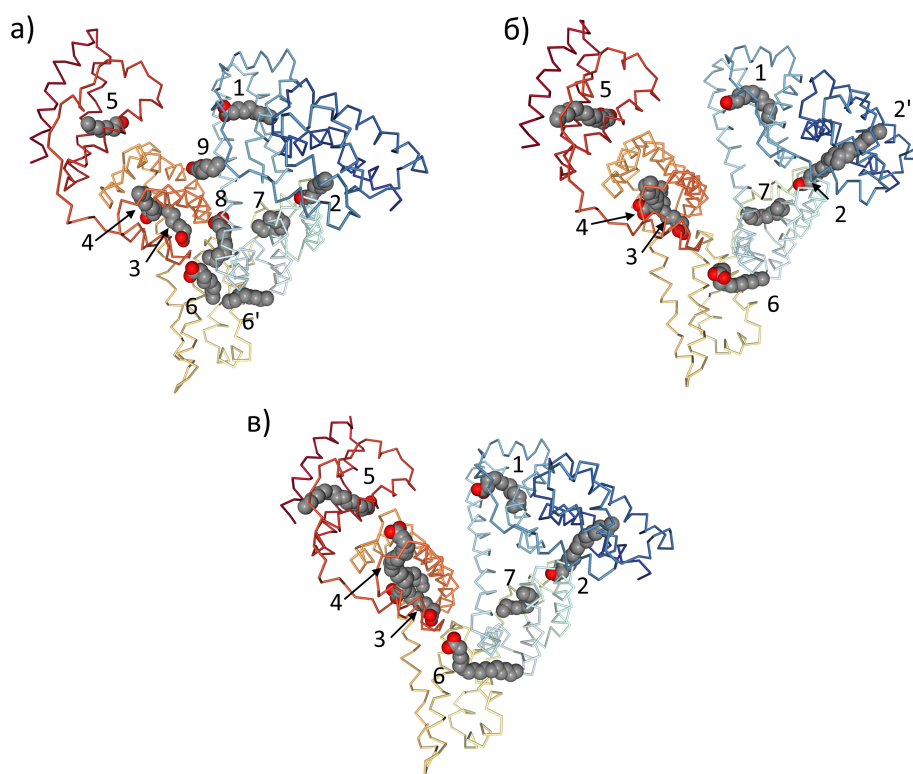
разлике. МВЛ2 је мање од МВЛ1, састоји се од главног региона за везивање лекова, а на њега се наставља мањи хидрофобни регион за који могу да се везују лекови тек након конформационих промена које прате везивање лека за главни регион МВЛ2. И поред тога што се МВЛ1 и МВЛ2 налазе у структурно слично организованим доменима, разлике се огледају и у томе што су МВЛ1 и МВЛ2 различито позиционирани у односу на остатак протеина. Улаз у МВЛ1 је окружен поддоменима ПБ и ПА, за разлику од улаза у МВЛ2 који није заклоњен на овај начин. Иако се на МВЛ2 надовезује поддомен ПБ, он може да ротира тако да улаз у МВЛ2 буде изложенији растварачу [94]. Како у МВЛ2, за разлику од МВЛ1, постоји само један поларни, базни кластер лоциран са једне стране улаза, за ово место се везују ароматични карбоксилати, чија је карбоксилна група удаљена од хидрофобног дела молекула [2,94]. Типичне лиганде за ово место представљају нестероидни антиинфламаторни лек ибупрофен и лек из класе бензодиазепина – диазепам [97].

Осим МВЛ1 и МВЛ2, пронађена су додатна места за везивање лекова, било да се ради о примарним или секундарним местима везивања. Тако се, на пример, неки лекови (нпр. N-ацетил-L-цистеин, цисплатин, D-пенициламин) везују ковалентно за Cys-34 [97], за анестетик пропофол је идентификовано да се везује за МВЛ2, али и за поддомен ПБ [92]; халотан се везује за МВЛ2, а такође и за површину између поддомена ПА и ПБ [92]. Релативно скоро (2013) је идентификован и поддомен IB као треће главно место за које се везују многи лекови и други лиганди [98].

2.1.2.1.2. Места везивања масних киселина

Сваки молекул СА у нормалним физиолошким условима везује 0,1-2 молекула неестерификованих масних киселина (МК) [3], мада моларни однос [МК]:[СА] може да буде много већи у случају поста, екстремног вежбања, или неких патолошких стања, као што су дијабетес, болести јетре или кардиоваскуларне болести [62]. Овако велики капацитет за везивање масних киселина, потиче од тога што за средње- и дуголанчане, засићене и незасићене МК у молекулу СА постоји седам заједничких места (МК1-МК7) различитих

афинитета, асиметрично распоређених у молекулу СА [52,53,99] (слика 5). Идентификована су и додатна четири места за МК средње дужине ланца (слика 5а и 5б) [52]. Места МК1-МК5 су места јачег везивања МК, захваљујући соним мостовима и водоничним везама које се формирају између карбоксилне групе из МК и позитивно наелектрисаних (аргинин и лизин) или поларних (серин и тирозин) бочних аминокиселинских остатака које се налазе на улазу у сваки од ових хидрофобних џепова. Насупрот томе, на местима МК6 и МК7 не постоји интеракција карбоксилне групе МК са бочним аминокиселинским групама, тако да се ова два места сматрају местима најслабијег афинитета [52,53,62,99]. Према афинитету, МК1-МК5 су класификована на следећи начин: МК4 и МК5 су места највећег афинитета, МК2 средњег, а МК1 и МК3 су места слабијег афинитета [2,62].



Слика 5. Приказ кристалне структуре комплекса ХСА са: а) деканоатом, б) миристинском и в) стеаринском киселином. На слици су означена бројевима 1-9 места за везивање средње- и дуголанчаних масних киселина која су до сада идентификована. За место означено бројем 2' се везују лауринска и миристинска ксиелина. Структуре су визуелизоване на сајту <https://www.rcsb.org/>, одакле су и преузете (PDB ID: 1e7e – деканоат, 1e7g – миристинска киселина, 1e7i – стеаринска киселина [94]).

МК1 лежи у центру поддомена IB и у поређењу са осталим местима везивања МК, релативно је приступачно растварачу. Хидрофобни реп дуголанчаних МК се увија у спиралу дуж унутрашње површине МК1 цепа, тако да врх метиленског репа сеже до отвора са друге стране овог везивног места [52].

МК2 се налази између поддомена IA и ПА и представља једно од најзатворенијих места, тако да је карбоксилна група МК заштићена од растварача [52,99]. Метиленски реп се простире линеарно кроз хидрофобни цеп који настаје поравнањем поддомена IA и ПА. Поравнање између ова два поддомена је последица конформационих промена које се догађају при везивању МК за МК2 место. МК2 се састоји из аминокиселина које се налазе у поддоменима IA и ПА. Везивањем МК за МК2, долази до приближавања ових аминокиселина за око 10 Å, тако да се формира целовито МК2 место. Претпоставља се да је везивање МК за МК2 узрок ротације домена I у односу на домен II, што се догађа при грађењу МК/ХСА комплекса. МК која се веже за МК2 представља спону између поддомена IA и ПА и стабилизује новонасталу конформацију албумина [52,99]. Такође је утврђено да при грађењу комплекса МК/ХСА, долази и до ротације домена III у односу на домен II, међутим узрок ове ротације није познат. Ротацијом домена I и III у односу на домен II се отвара централни цеп у албумину и ширина молекула се повећава са 80 на 90 Å [99].

Уочено је да се за МК2 везују по два молекула МК средње дужине ланца (лауринска и миристинска киселина) и то тако да су ови молекули међусобно антипаралелно оријентисани. Ово додатно место је обележено као МК2' и за њега могу да се вежу само краће МК. Карбоксилна група другог молекула МК се пружа као раставрачу на страну супротну од површине између поддомена IA и ПА. С обзиром на то да електронске мапе густине показују велику неуређеност за ову групу, претпоставља се да на месту МК2' карбоксилна група није везана соним мостовима или водоничним везама за бочне остатке поларних или базних аминокиселина [52].

МК3 и МК4 се налазе у поддомену IIIA и преклапају се са MB12. Молекули МК везани на овим местима се налазе међусобно под правим углом. Код МК веће дужине ланца, на месту МК3, долази до савијања метиленског репа у облику латиничног слова „U“, због тога што дубина овог цепа дозвољава

смештање максимално 12-14 C-атома. Код МК4, карбоксилна група МК гради водоничне везе са аргинином, тирозином и серином који леже на спољној површини са једне стране поддомена IIIA, док је метиленски реп испружен и простире се кроз хидрофобни тунел ка другој страни поддомена IIIA. У случају стеаринске киселине, метиленски реп се простире читавом ширином поддомена IIIA, тако да је врх репа у контакту са растварачем [52].

МК5 представља хидрофобни канал који се протеже целом ширином поддомена IIIB, тако да се МК везује за ово место у линеарној конформацији. Као и у случају МК4, само дуже МК, са 18 C-атома, су довољно дугачке да попуне целу дужину канала, тако да је и у МК5 врх метиленског репа изложен растварачу [52].

МК6 се налази у узаном каналу између поддомена IIA и IIIB, који не садржи кластере поларних аминокиселина који би координисали карбоксилну групу МК. Уместо тога, она показује слабе интеракције са поддоменом IIIB и то тако да различите МК заузимају различит положај карбоксилне групе. Науспрот томе, средњи део метиленског репа је добро „усидрен“. Кристалографска испитивања ХСА су показала да се на месту МК6 могу наћи два молекула деканоата у таквој конфигурацији да су метиленски репови окренути један ка другом и сусрећу се баш на месту где су метиленски репови дужих МК добро фиксирани. Место везивања другог молекула деканоата је означено као МК6' (слика 5a) [52].

МК7 се налази у поддомену IIA и поклапа се са МВЛ1. Како је већ поменуто, карбоксилна група није фиксирана, а метиленски реп се налази у савијеној конфигурацији [52,53].

МК8 и МК9 су додатна места везивања за која се према доступним подацима везује деканоат (а вероватно и краће МК) [52]. МК8 се налази у дубљем региону цепа између поддомена IIA-IB-IIA са једне стране и IIIB-IIIA-IIIB са друге стране (слика 5a). МК9 се налази у делу овог цепа ближем растварачу, тако да је ово место релативно отворено (слика 5a). Хидрофобни део места МК8 се формира везивањем деканоата за МК6. Са друге стране цепа се налази отвор који је окружен базним аминокиселинским остацима, међутим карбоксилна група МК не интерагује са овим аминокиселинама формирајући соне мостове, већ гради водоничну везу са серином [52]. МК9 се формира услед конформационих промена

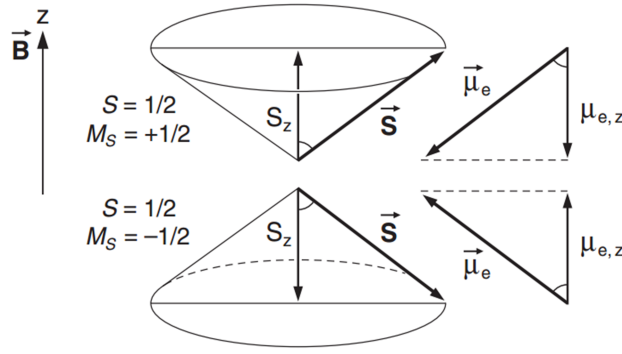
индукованих везивањем МК и стабилизовано је соним мостом између домена I и III [2,52].

2.2. Електронска парамагнетна резонанција

2.2.1. Општа теорија електронске парамагнетне резонанције

Електронска парамагнетна резонанција (ЕПР), у литератури другачије позната под називом електронска спинска резонанција, је техника за проучавање парамагнетика, хемијских врста које поседују бар један неспарен електрон. Ова техника се заснива на апсорпцији електромагнетног зрачења од стране парамагнетика у магнетном пољу.

Елементарне честице, као што су електрони, су окарактерисане унутрашњим механичким угаоним моментом који се назива спин. Угаони моменат је векторска величина окарактерисана својим модулом (интензитет вектора) и просторним правцем [100]. Електронском спину се приписује квантни број $S = 1/2$. У присуству јаког спољашњег магнетног поља \vec{B} , постаје важан други квантни број, а то је спински магнетни квантни број, који може да има вредности $M_S = +1/2$ (α -стање) или $M_S = -1/2$ (β -стање). У магнетном пољу вектор \vec{S} прецесује око вектора \vec{B} (слика 6). Дужина вектора је дата изразом $|\vec{S}| = \hbar\sqrt{S(S+1)}$, где је $\hbar = h/2\pi$, а h представља Планкову константу ($h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ J·s). Компонента вектора \vec{S} у правцу z-осе (за коју се узима да се поклапа са правцем вектора \vec{B}) је дата као $\hbar M_S$ и има вредности $+\hbar/2$ или $-\hbar/2$, који редом одговарају паралелној и антипаралелној оријентацији спина у односу на правац z-осе.



Слика 6. Прецесија вектора електронског спина слободног електрона, \vec{S} , око вектора спољашњег магнетног поља \vec{B} чији се правац узима за правац z-осе. На слици су приказане и оријентације вектора $\vec{\mu}_e$ у односу на вектор \vec{B} које се разликују за случај $M_S = -1/2$ и $M_S = +1/2$. (Преузето из [101].)

Електрон поседује и спински магнетни моменат, који је придружен спинском угаоном моменту. Овај магнетни моменат је дат једначином:

$$\vec{\mu}_e = \frac{-e g_e \vec{S}}{2 m_e} \quad (1)$$

где је e наелектрисање електрона ($e = 1,6022 \cdot 10^{-19}$ C), g_e је Ландеов g-фактор који за слободан електрон износи 2,0023, а m_e је маса мировања електрона ($m_e = 9,1096 \cdot 10^{-31}$ kg). Пројекција спинског магнетног момента на z-осу дата је једначином:

$$\mu_{e,z} = \frac{-e g_e \hbar M_S}{2 m_e} \quad (2)$$

где се $\hbar e / 2 m_e$ може заменити величином која се зове Боров магнетон ($\mu_B = 9,2741 \cdot 10^{-24}$ J/T). Спински магнетни моменат електрона $\vec{\mu}_e$ интерагује са спољашњим магнетним пољем \vec{B} (приказано на слици 6), при чему је енергија интеракције једнака негативној вредности скаларног производа ова два вектора:

$$E = -\vec{\mu}_e \cdot \vec{B} = -\mu_{e,z} B = +g_e \mu_B M_S B \quad (3)$$

Из једначине (3) се види да се у спољашњем магнетном пољу разликују енергије спинских стања електрона (што није случај у одсуству спољашњег магнетног поља), тј. укида се дегенерација по M_S . Разлика између енергија спинских стања $M_S = -1/2$ и $M_S = +1/2$ представља електронско Земаново цепање, које је пропорционално јачини магнетног поља, B . Прелази између два спинска нивоа се

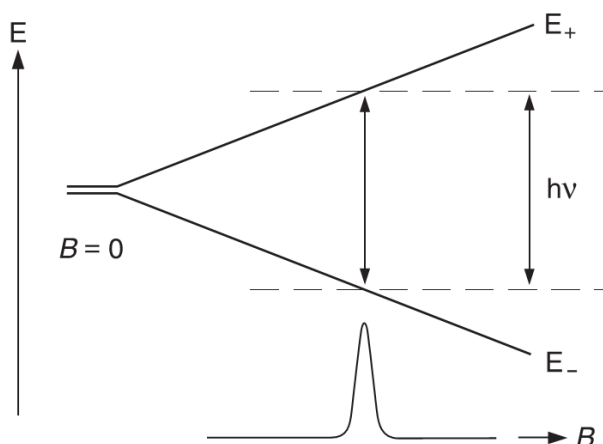
догађају према изборном правилу $\Delta M_S = \pm 1$ (слика 7). Ови прелази могу да се изазову електромагнетним зрачењем енергије $h\nu$ (ν је фреквенција електромагнетног зрачења), ако су испуњена два важна услова:

1) правац вектора магнетног поља које потиче од електромагнетног зрачења (\mathbf{B}_1) мора да буде нормалан на правац спољашњег магнетног поља \mathbf{B} (z-осу), тј. \mathbf{B}_1 треба да лежи у ху-равни;

2) енергија зрачења мора да буде једнака величини Земановог цепања:

$$h\nu = E_+ - E_- = g_e \mu_B B \quad (4)$$

Једначина (4) представља резонантни услов и важи и за системе у којима је $S > \frac{1}{2}$ (за сваку вредност S постоји $2S+1$ вредности магнетног броја M_S , при томе је $M_S = -S, -S+1, \dots, +S$), с обзиром на то да је изведен из једначине (3) уз услов да је $\Delta M_S = \pm 1$ [101].



Слика 7. Енергијски дијаграм Земановог цепања електронских спинских нивоа у спољашњем магнетном пољу и приказ постизања резонантног услова при озрачивању електромагнетним зрачењем одговарајуће енергије $h\nu$. (Преузето из [101].)

2.2.2. Хиперфина интеракција у изотропним системима

Као и електрон, и језгро може да има спински угаони моменат, $\mathbf{I} (\neq 0)$, којем је придружен одговарајући магнетни моменат, μ_n (за нуклеарни спин важе релације аналогне онима које су већ наведене за електронски спин у поглављу 2.2.1). Нуклеарни магнети момент μ_n , такође интерагује са спољашњим магнетним пољем, при чему долази до цепања нуклеарних спинских нивоа на $2I+1$ компоненту. Овај ефекат се зове нуклеарни Земанов ефекат. У присуству

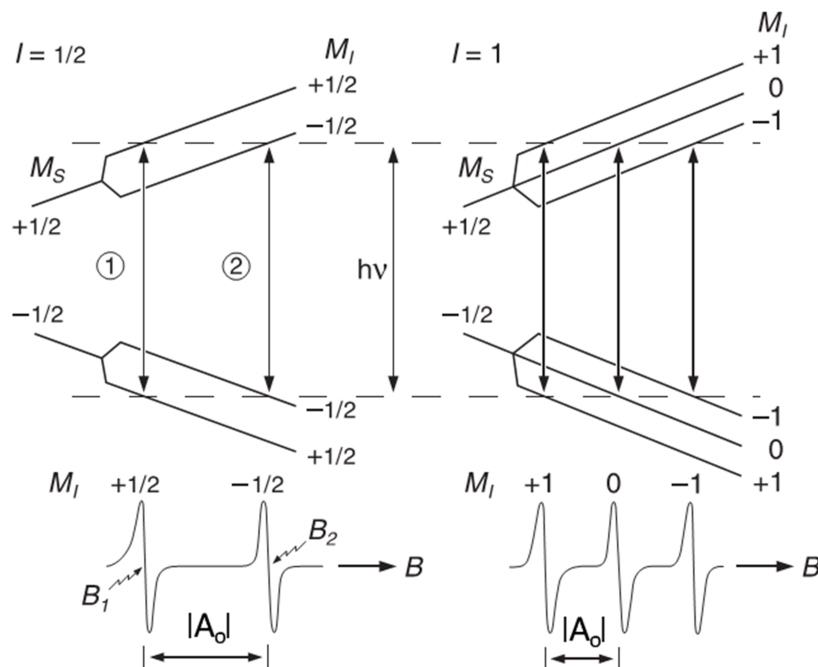
нуклеарног спина, електронски спин „осећа“ додатно магнетно поље које потиче од магнетног момента језгра. Ова интеракција између електрона и језгра се зове хиперфина интеракција и она има диполарни карактер (због тога што два магнетна дипола међусобно интерагују). Последица ове интеракције је цепање електронских спинских нивоа на $2I+1$ компоненту за свако језгро, што одговара мултиплетности нуклеарног спина ($M_I = -I, -I+1, \dots, I$). Енергија интеракције између магнетног момента електрона и спољашњег магнетног поља (једначина (3)) треба да се прошири за чланове који потичу од интеракције између језгра и магнетног поља, као и језгра и електрона:

$$E_{\text{tot}} = g_e \mu_B B M_S - g_N \mu_N B M_I + A_0 M_S M_I \quad (5)$$

где су g_N и μ_N , редом нуклеарни Ландеов g -фактор и нуклеарни магнетон, а A_0 представља изотропну константу хиперфиног цепања, меру интеракције између електрона и језгра [100,102]. Други члан у једначини (5) одговара интеракцији између језгра и спољашњег магнетног поља, док трећи члан представља енергију хиперфине интеракције [100,102]. Међутим, други члан у овој једначини може да се занемари, због тога што је $\mu_N \ll \mu_B$ [100].

Додатно изборно правило које важи за прелазе између електронских спинских нивоа услед хиперфиног цепања је $\Delta M_I = 0$ [100–102]. Када се неспарени електрон налази у близини само једног језгра нуклеарног спина I , услед цепања електронских спинских нивоа на по $2I+1$ компоненту и узимајући у обзир $\Delta M_I = 0$, доћи ће до $2I+1$ спинских прелаза, односно, у ЕПР спектру ће постојати $2I+1$ линија једнаких интензитета и на међусобно једнаким растојањима. Уколико се у околини неспареног електрона налази n нееквивалентних језгара нуклеарног спина I ($\neq 0$), укупан број линија ће бити $(2I+1)^n$, док ће се у случају n еквивалентних језгара неке од линија преклапати, тако да ће укупан број ЕПР линија бити $2nI+1$ [101]. На пример, ако је електрон у непосредној околини језгра чији је $I = 1/2$ (нпр. језгра ^{15}N или ^1H), према већ наведеним изборним правилима, дозвољена су само два прелаза. У случају језгра чији је спин $I = 1$, као што је нпр. ^{14}N догађаће се три прелаза (овај случај је уједно и најважнији, с обзиром на то да се у спинским пробама и облеживачима, коришћеним у овој дисертацији, слободан електрон налази између језгара ^{14}N и ^{16}O ; видети поглавље 2.3).

Хиперфина цепања и прелази за ова два случаја спинова језгра су приказана на слици 8.



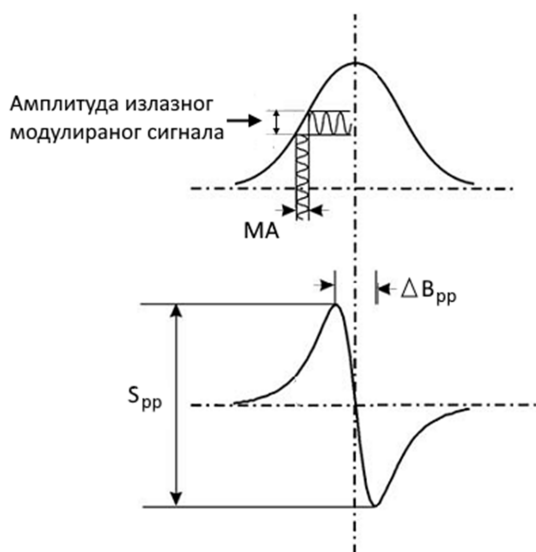
Слика 8. Хиперфина цепања електронских Земанових нивоа под утицајем једног језгра чији је спин $I = 1/2$ (лево) и $I = 1$ (десно). Испод приказа хиперфиних цепања приказани су одговарајући ЕПР сигнали који настају када је испуњен резонантни услов. Са B_1 и B_2 су означене вредности магнетне индукције на којима се догађају прелази означени са ① и ② (Прилагођено из [101]).

2.2.3. Параметри и облик ЕПР спектра

ЕПР спектар се обично добија континуалним озрачивањем узорка ниским интензитетом електромагнетног зрачења и то из области микроталаса³, док се магнетно поље континуално повећава у задатом опсегу око централног поља B_0 . Оваква ЕПР техника се назива континуални ЕПР. Други начин за добијање ЕПР спектра подразумева озрачивање узорака кратким пулсевима микроталасног зрачења веће снаге при чему је магнетна индукција константна (пулсни ЕПР). Сам

³ Стандардно се користи ЕПР спектрометар са радном фреквенцијом микроталаса 9,5 GHz, што за $g = 2,0023$ (слободан електрон), одговара вредностима поља 3500 G (гауса). Ова фреквенција одговара тзв. X-области микроталаса (8-12 GHz). Друге области у којима раде комерцијални ЕПР спектрометри су W- (95 GHz), Q- (~ 34 GHz), S- (3-4 GHz) и L-област (1-2 GHz) [100].

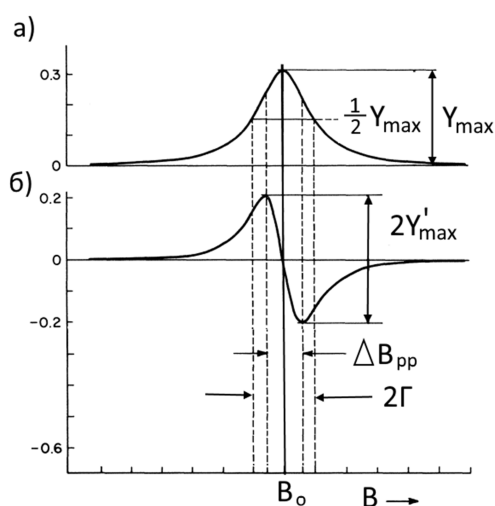
ЕПР спектар представља зависност апсорпције микроталасног зрачења од интензитета магнетне индукције. Међутим, за разлику од класичних спектра који се добијају другим спектроскопским техникама, ЕПР спектар се приказује као деривативна крива (први извод апсорпционог спектра). Добијање деривативне криве је последица примене модулационог поља. Ово поље се примењује у правцу паралелном са главним пољем, и осцилује по хармонијском (синусном) закону са модулационом фреквенцијом (ν_{mod}) која обично износи 100 kHz и модулационом амплитудом (MA) која мора пажљиво да се одабере како би се избегли премодулација и губљење значајних информација из ЕПР спектра (о утицају MA на облик ЕПР спектра ће бити више речи у поглављу 2.2.3.3). Примена модулационог поља омогућава фазно осетљиву детекцију сигнала чиме се повећава осетљивост спектрометра, тј. побољшава се однос сигнал/шум. Поље које „осећа“ узорак представља збир главног поља чија се вредност постепено линеарно повећава и модулационог променљивог поља. Када се достигне резонантни услов, осцилаторно поље модулира резонантно поље фреквенцијом од 100 kHz, тако да је излазни сигнал такође модулиран, тј. има облик синусоиде чија је фреквенција исто 100 kHz, док је амплитуда (S_{pp}) пропорционална нагибу на апсорпциону криву за дату вредност магнетног поља. Коришћењем фазно осетљивих појачавача, или фазно осетљивих детектора, синусоидни сигнал се трансформише у једносмерни струјни сигнал [100]. Принцип модулације сигнала је приказан на слици 9.



Слика 9. Схема модулације сигнала модулационим магнетним пољем амплитуде MA и добијање ЕПР деривативног спектра. Деривативни ЕПР сигнал је окарактерисан амплитудом S_{pp} која је пропорционална нагибу праве (тангенте) на апсорпциону криву за дату вредност магнетног поља. (Прилагођено из [100].)

ЕПР спектри су окарактерисани следећим параметрима: позицијама апсорпционих линија (које су одређене g -фактором), бројем линија, интензитетима појединачних линија, односима интензитета различитих линија, растојањем између њих (што потиче у највећој мери од хиперфине интеракције), ширином и обликом линија. Сви ови параметри су повезани са структуром хемијске врсте од које потиче спектар, интеракцијом те врсте са околином, као и динамичким процесима у којима учествује [100].

Као и у случају свих квантномеханичких прелаза, и ЕПР линије имају коначну ширину која потиче од коначног времена живота, τ , вишег спинског стања, при побуђивању електронских спинова из нижег у виши енергијски ниво. Према Хајзенберговом принципу неодређености који гласи $\tau \Delta E \geq \hbar$ (где је ΔE неодређеност енергије система) што је време живота побуђеног стања краће, неодређеност енергије ΔE тог стања је већа, а последично и ширина линије. Овакво ширење линије је хомогено, и дефинише минималну ширину за дати систем. Последица овог ширења је Лоренцовски облик линије [102]. Ширина линије се обично посматра као полуширина на полувисини апсорпционог спектра и означава се са Γ или као растојање између максимума и минимума пика на деривативном ЕПР спектру, ΔB_{pp} (слика 10) [103].



Слика 10. а) Апсорпциони спектар са назначеним параметрима – ширина је дата са 2Γ и мери се на половини висине спектра, Y_{max} . б) Типичан ЕПР спектар који представља први извод апсорпционог спектра. Ширина деривативног спектра се означава са ΔB_{pp} и мери се од максимума до минимума ЕПР пика чија је амплитуда обележена као $2Y'_{max}$. (Прилагођено из [103].)

Ширење ЕПР линије је последица два типа процеса релаксације спинова, која су позната под називима спин-решетка (ова врста релаксације се другачије зове и спин-околина релаксација или T_1 -релаксација) и спин-спин релаксација

(T_2 -релаксација). У првом случају, при релаксацији се енергија ослобађа и предаје (кристалној) решетки у виду фонона, односно вибрационим, ротационим и транслационим степенима слободе молекула који се налазе у околини. Код спин-решетка релаксације, енергија експоненцијално опада са временом, а експоненцијална временска константа се обележава са T_1 и зове се спин-решетка релаксационо време. У случају спин-спин релаксације, постоји размена енергије између електронских спинова, услед интеракције суседних електронских спинских магнетних момената. Временска константа T_2 , спин-спин релаксационо време, се користи за карактерисање оваквог процеса релаксације. Ширина линије ΔB_{pp} зависи од релаксационих времена према следећем изразу:

$$\Delta B_{pp} \propto \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (6)$$

Уопштено гледано, $T_1 > T_2$, а ширина линије највише зависи од спин-спин интеракције. T_2 се смањује при повећању концентрације спинова, односно зависи од растојања између спинова у систему. Са друге стране када време T_1 постане веома кратко (око 10^{-7} s), T_1 -релаксација даје значајан допринос ширини линије [104]. На слици 11 је илустрован ефекат спин-спин релаксације на примеру 5-доксил-стеаринске киселине (5-ДС)⁴, спинског обележивача коришћеног у експериментима описаним у овој докторској дисертацији. Уколико је обележивач 5-ДС у воденом раствору присутан у довољно ниским концентрацијама (мањим од критичне мицеларне концентрације), ЕПР спектар овог једињења ће се састојати од три уска пика скоро једнаких интензитета. Међутим, при повећању концентрације 5-ДС изнад критичне мицеларне концентрације, услед формирања мицеле, доксил групе⁵ ће бити густо паковане једна уз другу, тако да ће постати доминантна спин-спин релаксација, а ЕПР спектар ће се састојати од једног широког пика [19].

⁴ Овај обележивач је дериват стеаринске киселине и као такав је слабо растворљив у води, тако да при веома ниским концентрацијама формира мицеле.

⁵ Доксил група је парамагнетна аминоксилна група, која садржи несапрен електрон у близини језгра ^{14}N , те стога даје ЕПР сигнал. У поглављу 2.3. ће бити детаљније описана аминоксилна једињења.



Слика 11. ЕПР спектар 5-доксил-стеаринске киселине (5-ДС) у води, при концентрацији која одговара граници растворљивости (горе) и ЕПР спектар 5-ДС чија је концентрација у воденом раствору већа од критичне мицеларне концентрације (доле). Горњи спектар се састоји од три уска пика приближно једнаких интензитета. Доњи спектар се састоји из две компоненте – 5-ДС који се налази у раствору (три уска пика) и 5-ДС који формира мицелу (један широк пик). У мицели, услед густог паковања доксил група које садрже слободне електроне, постаје изражена спин-спин релаксација, што се у ЕПР спектру манифестује појавом једног широког пика. (Преузето из [19]).

Ширење ЕПР линија се може поделити на хомогено и нехомогено. Хомогено ширење се догађа када сви спинови у посматраном узорку „осећају“ исто, временски усредњено магнетно поље, што значи да је облик линије (тј. вероватноћа прелаза) иста за сваки магнетни дипол. У тим случајевима је линија која се детектује Лоренцовског облика. Са друге стране, уколико неспарени електрони у узорку не „доживљавају“ резонанцију при истим вредностима поља **В**, сигнал који се добија представља збир сигнала великог броја појединачних компоненти (спинских ансамбала) који су померени једни у односу на друге на оси магнетног поља. Резултујућа линија је Гаусовског облика [100,102]. Нехомогено ширење је значајно када су спински системи у узорку оријентисани услед споре ротације, због чега се јавља анизотропија о чему ће бити више речи у поглављима 2.2.3.1. и 2.2.3.2.

Осим својстава самог узорка, на облик ЕПР спектра може да утиче и варирање параметара ЕПР спектрометра, што ће бити укратко описано у поглављима 2.2.3.3. и 2.2.3.4.

На овом месту треба истаћи да сви фактори који утичу на ширење линија, утичу такође и на висину пика у апсорпционом спектру (Y_{\max} на слици 10а) или

амплитуду између максимума и минимума пика на деривативном спектру ($2Y'_{\max}$ на слици 10б; ова величина се често у литератури обележава као A_{pp} или S_{pp}). То се може објаснити тиме што је интензитет⁶ линије дефинисан као површина, тј. први интеграл испод апсорпционе криве, односно други интеграл деривативног спектра. Уколико су ширине линија два сигнала једнаке, величина A_{pp} ће бити пропорционална интензитетима пикова. Међутим, за два сигнала истог интензитета, а различите ширине, S_{pp} ће бити различито, због важења релације:

$$I \propto S_{pp}(\Delta H_{pp})^2 \quad (7)$$

где је I , површина испод апсорпционе криве, односно интензитет спектра [103].

2.2.3.1. Анизотропија хиперфине интеракције (А-анизотропија)

У општем случају, енергија диполарне интеракције (E_{dip}) између два диполна момента $\vec{\mu}_1$ и $\vec{\mu}_2$ може се приказати изразом:

$$E_{dip} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \left(\frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \right) \quad (8)$$

где \mathbf{r} представља растојање између диполних момената, а μ_0 је магнетна пермеабилност вакуума ($4\pi \cdot 10^{-7} \text{ N A}^{-2}$). Ако се у једначини (8) $\vec{\mu}_1$ и $\vec{\mu}_2$ замене са $\vec{\mu}_e$ и $\vec{\mu}_n$, добија се:

$$E_{dip} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) g_e \mu_B g_N \mu_N \left(\frac{\vec{S} \cdot \vec{I}}{r^3} - \frac{3(\vec{S} \cdot \vec{r})(\vec{I} \cdot \vec{r})}{r^5} \right) \quad (9)$$

где је $\mathbf{r} = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$, положај електрона у односу на координатни систем чији је почетак смештен у посматрано језгро. Како сваки од момената може да се разложи на три компоненте и узимајући у обзир да E_{dip} треба да се усредњи по електронској дистрибуцији, добија се

$$A'_{ij} S_i I_j = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) g_e \mu_B g_N \mu_N \left\langle \left(\frac{\delta_{ij}}{r^3} - \frac{3i_j}{r^5} \right) \right\rangle S_i I_j \quad (10)$$

где су i и $j = x, y, z$, δ_{ij} је делта функција дефинисана као $\delta_{ij} = 0$ и $\delta_{ii} = 1$. На овај начин се добија девет чланова A'_{ij} (ознака ' се односи на то да је ово анизотропни

⁶ Иако се овде под интензитетом, I , подразумева површина испод апсорпционе криве, у каснијим поглављима ће овај термин бити коришћен да означи висину одређених пикова на деривативној кривој.

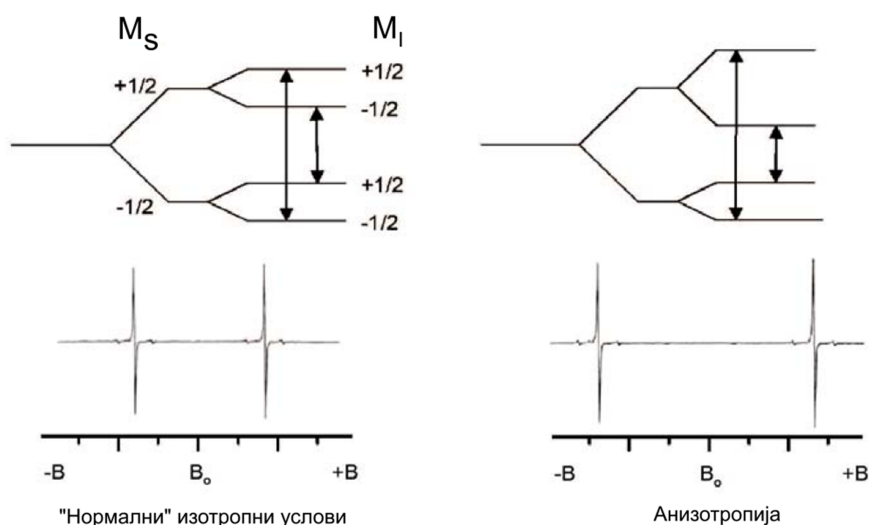
тензор) који се могу приказати као симетрична матрица димензија 3x3. Ова матрица се зове тензор хиперфине анизотропије и бирањем одговарајућег координатног система може се трансформисати у следећу матрицу:

$$\mathbf{A}' = \begin{pmatrix} A'_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & A'_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & A'_{zz} \end{pmatrix}$$

Траг ове матрице, $\text{Tr}(\mathbf{A}')$ је једнак нули [100]. Укупан тензор хиперфиног цепања може се приказати као збир изотропног и анизотропног тензора: $\mathbf{A} = \mathbf{A}_0 \mathbf{I}_3 + \mathbf{A}'$. \mathbf{I}_3 је јединична матрица димензија 3x3. Траг матрице \mathbf{A} , $\text{Tr}(\mathbf{A}) = 3\mathbf{A}_0$. У матрици \mathbf{A} , на дијагонали се налазе чланови A_{xx} , A_{yy} и A_{zz} , док су чланови ван дијагонале једнаки нули [102]. Диполарна енергија између електронског и нуклеарног спина се може приказати следећим изразом:

$$E_{\text{dip}} = A_{xx} S_x I_x + A_{yy} S_y I_y + A_{zz} S_z I_z \quad (11)$$

Овај члан се придодаје енергији Земанове и изотропне хиперфине интеракције (једначина (5)) да би се одредила укупна енергија интеракције електронског и нуклеарног спинског система у магнетном пољу. Диполарна енергија је анизотропна, пошто компоненте електронског и нуклеарног спина зависе од правца вектора $\vec{\mathbf{B}}$ у односу на x-, y- и z-осу. На основу овога се закључује да хиперфино цепање ЕПР линија зависи од оријентације електронских и нуклеарних спинова у односу на правац спољашњег магнетног поља, а самим тим, и од оријентације молекула у односу на вектор $\vec{\mathbf{B}}$. Када парамагнетни молекул брзо ротира у нормалном течном раствору, све молекулске оријентације се брзо постижу, тако да се диполарне интеракције усредњавају. Међутим, ако је кретање парамагнетног молекула из неког разлога ограничено (кристал, вискозни раствор, молекул везан за протеин или уграђен у мембрану), анизотропија \mathbf{A} -тензора долази до изражаја и манифестује се у ЕПР спектру кроз промене у растојању између линија насталих хиперфиним цепањем (слика 12) [100,105].



Слика 12. Схематски приказ цепања електронских спинских нивоа услед хиперфине интеракције са језгром нуклеарног спина $I = 1/2$ и померања ЕПР линија у изотропним и анизотропним условима. (Прилагођено из [105].)

2.2.3.2. Енергијска анизотропија (*g*-анизотропија)

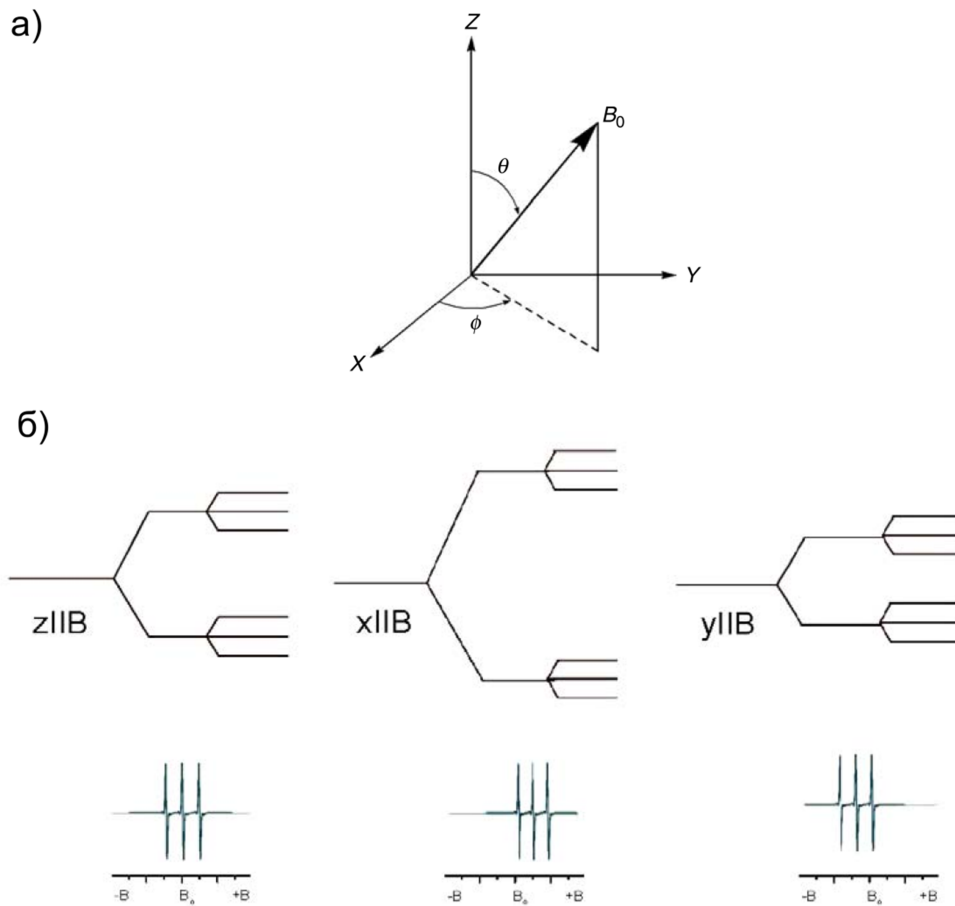
Осим константе хиперфиног цепања, и Ландеов g -фактор је у општем случају анизотропна величина која се може приказати тензором. Анизотропија g -фактора потиче од тога што ефективно поље (\mathbf{B}_{eff}) које електрон „осећа“ не потиче само од спољашњег примењеног магнетног поља, већ и од локалних поља. Ова локална поља потичу од спин-орбиталног спрезања које је занемарљиво у случају сферно симетричних молекула. Међутим, како су неспарени електрони обично асиметрично дистрибуирани у молекулима, спин-орбитална спрега ће давати мали допринос орбиталног момента, што ће утицати на вредност g -фактора. Допринос орбиталног карактера укупном угаоном моменту је различит дуж различитих праваца у координатном систему молекула. Отуда је спин-орбитална интеракција анизотропна, као и локална поља која осећа електрон. Последице, g -вредности ће зависити од оријентације вектора \vec{B} у односу на молекулске осе. Што је мања симетрија молекула, то ће бити израженија g -анизотропија [100,102]. Тензор g -вредности се приказује аналогно тензору A :

$$\mathbf{g} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix}$$

Ефективна g -вредност за случај ромбичне симетрије може се приказати као:

$$g^2 = g_{xx}^2 \cdot \sin^2 \theta \cdot \cos^2 \phi + g_{yy}^2 \cdot \sin^2 \theta \cdot \sin^2 \phi + g_{zz}^2 \cdot \cos^2 \theta \quad (12)$$

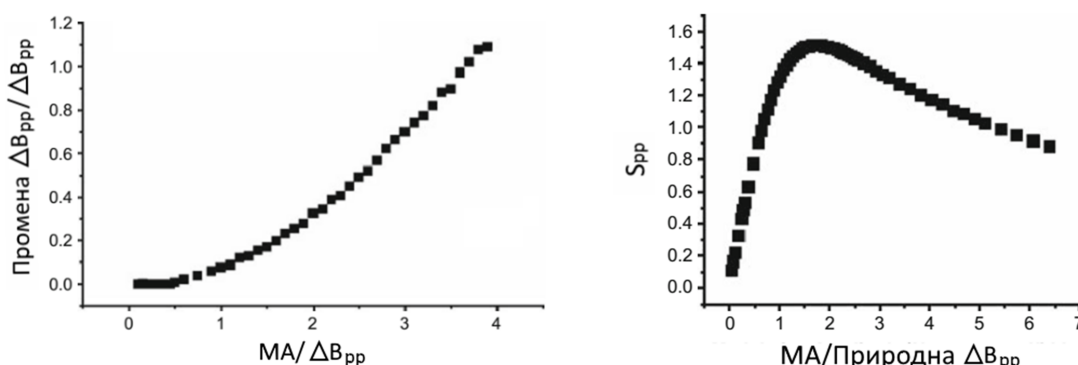
где су θ и ϕ поларни углови између вектора спољашњег магнетног поља \vec{B} у изабраном молекуларном координатном систему (слика 13а) [100]. Последица g -анизотропије је померање пикова у ЕПР спектру (слика 13б) [105]. Као и у случају A -тензора, ова анизотропија долази до изражаја, ако је из било ког разлога посматрани парамагнетик имобилисан, а са друге стране, локална поља која доводе до g -анизотропије се усредњавају, уколико овај молекул може брзо слободно да ротира у свим правцима [102].



Слика 13. а) Оријентација вектора спољашњег магнетног поља, B_0 , у молекуларном координатном систему изабраном за конструкцију g -тензора (преузето из [100]). б) Схема цепања електронских спинских нивоа услед утицаја g -анизотропије. Приказани су случајеви када је вектор спољашњег магнетног поља, B_0 паралелан са z -, x - и y -осом (преузето из [105]).

2.2.3.3. Утицај модулационе амплитуде на ЕПР спектар

Претходно је објашњено да се модулационо поље примењује како би се побољшао однос сигнал/шум. При бирању **МА** треба имати на уму да ће она утицати на ширину и амплитуду линије у ЕПР спектру. Уколико се **МА** повећава почевши од малих вредности **МА** ($1/10 \Delta V_{pp}$), са слике 14 се уочава да ће амплитуда S_{pp} да расте до одређене вредности **МА** после које ће почети да опада услед премодулације. Са друге стране ширина ΔV_{pp} се неће мењати до одређене вредности **МА**, после које линија почиње да се шири. Вредност ΔV_{pp} која је константа до одређене вредности **МА** се сматра за природну ширину линије [106]. Обично **МА** треба да износи до 10 % ширине пика (ΔV_{pp}), а уколико се при томе добије лош однос сигнал/шум може да се повећа и до $1/3 \Delta V_{pp}$ [106].

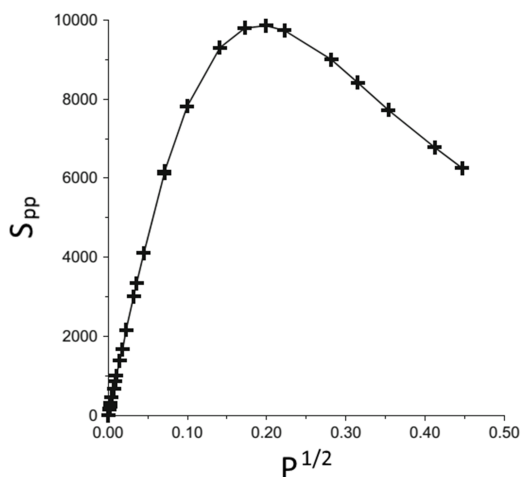


Слика 14. Утицај вредности модулационе амплитуде (**МА**) на ширину (леви график) и амплитуду (десни график) ЕПР линије. (Прилагођено из [106].)

2.2.3.4. Утицај снаге микроталасног зрачења на ЕПР спектар

Понекад је ради добијања ЕПР спектра са што бољим односом сигнал/шум, потребно осим **МА**, варирати и снагу (**P**) микроталаса којима се озрачује узорак. При озрачивању узорка паралелно се догађа неколико процеса: побуђивање спинова, релаксација, а при великим снагама, долази и до стимулисане емисије. До сатурације долази када је брзина прелаза са нижег на виши спински ниво (брзина побуђивања) једнака брзини прелаза са вишег нивоа на нижи (укупној брзини релаксације и стимулисане емисије). У том случају не долази до трансфера енергије између V_1 и спинског система, тако да последично сигнал нестаје [102].

На слици 15 је приказан утицај повећања снаге на S_{pp} . Примећује се да при нижим снагама S_{pp} линеарно расте са $P^{1/2}$, а потом достиже максимум и опада са даљим повећањем P . Истовремено се смањењем S_{pp} дешава се и ширење линија. Експерименте би требало изводити при вредностима P , за које крива зависности $S_{pp} = f(P^{1/2})$ показује линеарност [106].



Слика 15. Зависност амплитуде ЕПР сигнала од корена снаге микроталасног зрачења. (Прилагођено из [106].)

2.3. Спинско обележавање протеина

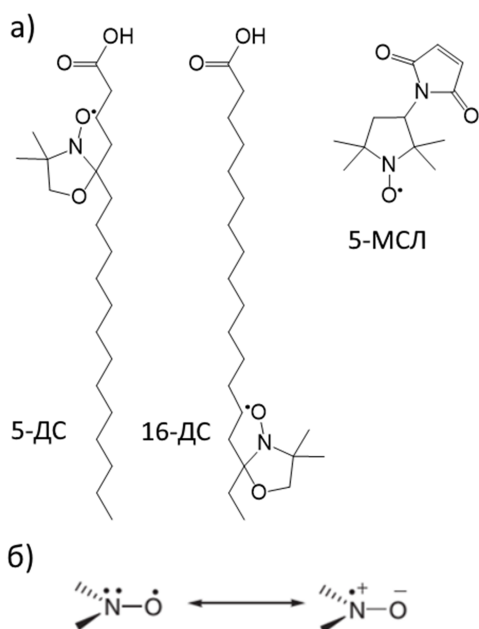
Структура и конформационе промене протеина могу да се проучавају разним експерименталним техникама. За одређивање тродимензионалне структуре протеина се најчешће користе мултинуклеарна спектроскопија нуклеарне магнетне резонанције (НМР) или рендгено-структурна анализа. Ове две технике могу да се користе и за праћење конформационих промена, међутим због сложености ових техника, чешће се у те сврхе користе друге физичкохемијске методе. Промене у секундарној структури се често прате циркуларним дихроизмом и вибрационом спектроскопијом (инфрацрвеном и Раманском), а применљиве су и за проучавање промена у терцијарној структури [10,107–109]. За праћење конформационих промена протеина често се користе и флуоресцентна спектроскопија (углавном гашење флуоресценције триптофана услед структурних промена, анизотропија флуоресценције унутрашњих или спољашњих флуорофора [110]) и диференцијална скенирајућа калориметрија [109]. Једна од техника која се користи за проучавање протеина јесте и ЕПР спектроскопија. У овом случају

потребно је протеин спински обележити, што подразумева инкорпорирање тзв. спинске пробе или спинског обележивача⁷ у испитивани систем (протеин), тако да је пертурбација структуре испитиваног система сведена на минимум [17].

Једињења која се обично користе као обележивачи су деривати цикличних аминоксила (често се зову нитроксиди), класе парамагнетних једињења која садрже аминоксилну групу, $>\text{N-O}^\bullet$ (слика 16а). Аминоксилна група је окарактерисана троелектронском $\pi_{\text{N-O}}$ везом која настаје услед преклапања $2p_z$ орбитала азота и кисеоника, и додатно садржи један неспарени електрон од којег потиче парамагнетни карактер ове класе једињења [112,113]. Тај неспарени електрон је делокализован између атома азота и кисеоника, с тим да је ближи атому кисеоника, због његове веће електронегативности [112,113]. Неспарени електрон на аминоксилној групи је стерно заштићен углавном метил групама које су везане за суседне атоме угљеника (C-атоми који се налазе у α положају у односу на N-атом из аминоксилне групе). Спинска густина зависи од угла под којим се налази N-O веза у односу на раван коју одређују друге две везе које формира азот, поларности и протичности околине. Стога, у зависности од ових фактора, N-O веза може да постоји у два мезомерна облика (слика 16б) [112]. Постојање N-O везе у две резонантне форме од којих је једна електронеутрална, а друга наелектрисана, је од велике важности са тог становишта да равнотежа између резонантних структура може да се мења у зависности од поларности средине. У неполарној средини, неспарени електрон је локализован на кисеонику, док је у поларној средини већа спинска густина на азоту. Ове разлике се могу уочити на ЕПР спектру, кроз константу хиперфиног цепања која потиче од атома

⁷ Термин спинска проба се често користи уместо термина спински обележивач и обрнуто, међутим, научници који се дуго баве овим пољем науке су дефинисали разлику између ова два појма. Под спинским обележивачима се сматрају парамагнетни молекули који се ковалентно везују за тачно одређено место другог молекула [111]. У овом докторату су према тим критеријумима коришћене две спинске пробе (стеаринска киселина **обележена** доксил групом на различитим позицијама у метиленском ланцу) и један спински обележивач који се ковалентно везује за слободан цистеин (3-малеимидо-проксил). Међутим, пошто се доксил-стеаринске киселине за албумин везују углавном доста јаким интеракцијама, ради једноставности у наставку доктората ће се и за ове молекуле користити термин спински обележивач.

азота (A_N) [113]. Уопштено, са повећањем поларности средине, A_N се повећава, стабилизујући наелектрисани облик [112].

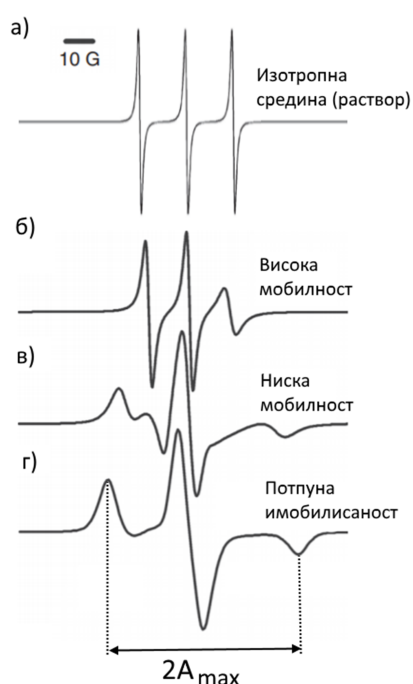


Слика 16. а) Хемијске формуле обележивача коришћених у овој докторској дисертацији: 5-доксил-стеаринска киселина (5-ДС), 16-доксил-стеаринска киселина (16-ДС) и 3-малеимидо проксил (5-МСЛ). **б)** Резонантне структуре аминоксилне групе. Ненаелектрисна структура (лево) је доминантна у неполарној средини, а у поларној средини наелектрисана форма (десно). (Преузето из [112].)

Везивањем погодног обележивача за протеин и коришћењем одговарајуће ЕПР методе⁸ могу се проучавати: 1) мобилност аминокиселинских бочних група; 2) поларност непосредне околине; 3) интрамолекулска или интермолекулска растојања (између два аминоксилна обележивача) која се крећу у опсегу $\sim 8-80 \text{ \AA}$; 4) могуће је идентификовати елементе секундарне структуре помоћу тзв. аминоксилног скенирања (везивањем аминоксила за различите варијанте протеина, добијених мутагенезом на специфичном месту); 5) промене у конформацији активног места протеина изаване везивањем лиганда; 6) разматавање и савијање протеина; 7) интеракције између два молекула протеина, и протеина и липида [17,18,114,115].

⁸ Овде треба нагласити да се не могу све ове информације добити коришћењем традиционалног континуалног ЕПР спектрометра радне фреквенције у Х-области, већ се у неким случајевима морају користити напредније, пулсне ЕПР технике и/или више радне фреквенције (нпр. одређивање интрамолекулских и интермолекулских растојања, поларности околине обележивача у протеину) [18].

Како је објашњено у поглављу 2.2.2, у раствору молекули обележивача могу слободно да ротирају, тако да се резултујући ЕПР спектар састоји из три уска пика приближно једнаких интензитета, која се добијају услед хиперфине интеракције између језгра азота (чији је нуклеарни спин $I = 1$) и неспареног електрона [17,18,116] (слика 17а). У овом случају, \mathbf{g} - и \mathbf{A} -тензор су потпуно усредњени и до изражаја долазе само изотропне величине \mathbf{g}_0 и \mathbf{A}_0 . Међутим, када је ротација молекула обележивача ограничена услед везивања за протеин, укупни изглед ЕПР спектра се мења, тј. долази до асиметричног ширења спектра, које настаје као последица анизотропије \mathbf{g} - и \mathbf{A} -тензора (слика 17, б-г). Када се обележивач веже за протеин, он може да се у извесној мери помера у односу на протеин, тј. долази до делимичног усредњавања вредности \mathbf{g} - и \mathbf{A} -тензора. Међутим, брзина ротације целог молекула протеина има додатни утицај на изглед спектра и брзину кретања спинског обележивача [117]. Укупна брзина ротације молекула обележивача се приказује кроз ротационо корелационо време, τ_c , величину која приказује колико времена молекул проводи у одређеној оријентацији, уколико је анизотропија условљена само Брауновим кретањем. Уколико осим насумичног кретања долази и до промена конформације, τ_c ће зависити и од средњег времена живота одређене молекулске конфигурације [17]. У раствору мале вискозности (као што је водени), на собној температури, ред величине τ_c слободног обележивача износи око 10 ps (слика 17а), док за случај обележивача везаног за протеин, τ_c обично износи 1-100 ns (слика 17в), што је последица брзине ротације протеина. Као што се види са слике 17, што је спорија ротација молекула обележивача, тј. што је веће τ_c , спектар је све шири, тј. расте вредност параметра $2\mathbf{A}_{\max}$, који се читава са ЕПР спектра као растојање између максимума првог „пика” и минимума последњег „пика” [116,117]. Вредност $2\mathbf{A}_{\max}$ одређена за замрзнути раствор, када се достиже граница ригидности (а τ_c износи $\sim 10^{-3}$ s), одговара величини $2\mathbf{A}_{zz}$ из \mathbf{A} -тензора [111]. Према томе, $2\mathbf{A}_{\max}$ може да се користи као мера мобилности обележивача везаног за протеин, и на основу промена овог параметра могу се пратити конформационе промене протеина [54,55,59].



Слика 17. Типични ЕПР спектри аминоксилног спинског обележивача: **а)** у изотропној средини (раствору ниске вискозности); **б)** у средини у којој је ротација брза, али постоји низак степен имобилисаности обележивача (обележивач се налази везан на површини протеина или је растворен у вискозном медијуму); **в)** јако имобилисаног у молекулу протеина; **г)** потпуно имобилисаног, као нпр. у замрзнутом стању. (Прилагођено из [18].)

2.3.1. Спинско обележавање хуманог и говеђег серумског албумина

За проучавање конформационих промена албумина ЕПР спектроскопијом употребљено је неколико спинских обележивача. С обзиром на то да албумин везује масне киселине са великим афинитетом, најчешће су коришћени обележивачи који представљају парамагнетне деривате стеаринске киселине – доксил-стеарате [9,11,12,19–43]. Код ових спински обележених масних киселина, парамагнетна доксил група (аминоксилна група која даје ЕПР сигнал) је ковалентно везана за неки од С-атома из метиленског ланца (слика 16). Приликом израде експерименета у оквиру ове докторске дисертације, коришћене су две различите доксил-стеаринске (ДС) киселине које садрже доксил групу на супротним крајевима угљоводоничног ланца, једна на петом С-атому (5-доксил-стеаринска киселина, 5-ДС), а друга на шеснаестом С-атому (16-доксил-стеаринска киселина, 16-ДС). Доксил група у молекулу 5-ДС се налази близу карбоксилне групе, преко које се масне киселине везују за позитивно наелектрисане или поларне бочне групе аминокиселина (у случају места МК1-МК5), док је у молекулу 16-ДС ова група позиционирана готово на самом крају метиленског ланца [53,99]. Према литератури, доксил група 5-ДС се налази имобилисана дубље у унутрашњости албумина, док у случају 16-ДС ова група са

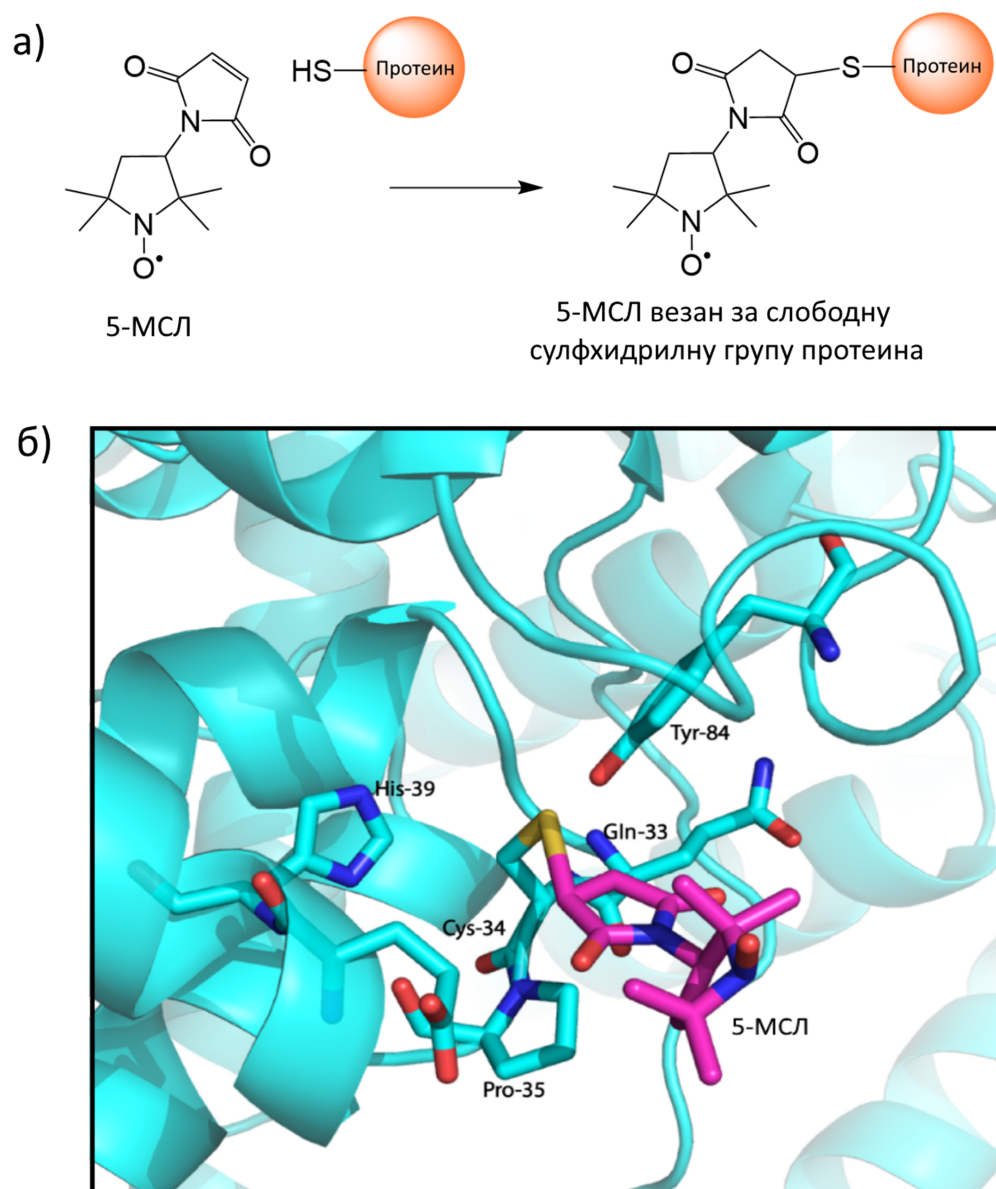
унутрашње стране прилази површини албумина или чак пролази кроз њу [20,21]. Према томе, 5-ДС и 16-ДС дају информације о конформационим променама са различитих места у албумину.

На основу теоријског испитивања везивања 5-ДС за ХСА и БСА молекулским докингом, претпоставља се да се места за везивање 5-ДС у ХСА и БСА поклапају са местима за која се везују обичне МК [22]. Такође, у оквиру ових истраживања је установљено и да се прорачунате најстабилније конформације 5-ДС у ХСА и БСА слажу са конформацијама стеаринске киселине, које су добијене кристалографским испитивањима [22]. Овакви подаци, нажалост, нису доступни у литератури за 16-ДС.

5-ДС, 16-ДС и други доксил-деривати масних киселина су најчешће коришћени како би се окарактерисала места везивања ових молекула (израчунале константе афинитета и број места, одредио положај доксил групе и степен њене имобилисаности код различитих деривата) за ХСА и БСА [19,23–32,34,36]. Пре неколико година, публиковано је неколико научних радова у којима се помоћу ЕПР технике познате под називом *Double Electron-Electron Resonance* (ДЕЕР, Дупла Електрон-Електрон Резонанција) мере растојања између доксил група 5-ДС или 16-ДС који се налазе у комплексима са ХСА [20,38,40,118]. На основу измерених растојања направљени су модели структуре и положаја места везивања масних киселина у ХСА. Осим тога, обележавањем ХСА и БСА са 5-ДС и 16-ДС проучаване су и интеракције албумина са вештачким липидним мембранама [119,120], јонским течностима [21,37], јонским сурфактантима [11,12,22,35,42] и металним комплексима [33,41,43].

16-ДС је у спрези са ЕПР спектроскопијом коришћен и као маркер за неколико болести: различите врсте тумора [46–51], атеросклерозу [44], дијабетес мелитус [44], цирозу и инсуфицијенцију јетре [45] и сепсу [46]. Овај дијагностички тест почива на детекцији промена у везивању 16-ДС за албумин из крвног серума или плазме пацијената оболелих од поменутих болести у односу на здраве контроле. Промена у капацитету везивања 16-ДС за албумин потиче од присуства везаних метаболита за албумин (токсина, полипептида или малих молекула), што све представља последице одређених патолошких стања.

Како молекул албумина може да веже и до седам молекула дуголанчаних масних киселина, а још додатно везане масне киселине могу међусобно да измењују места [24], конформационе промене се детектују истовремено са неколико различитих места на албумину. Због тога је у овој докторској дисертацији коришћен и спински обележивач који се специфично ковалентно везује за сулфхидрилну групу цистеина – 3-малеимидо-проксил (уобичајена скраћеница у литератури је 5-МСЛ од енглеског *5-maleimido spin label*, слика 16). На слици 18а је приказана реакција 5-МСЛ са слободном сулфхидрилном групом у протеину. Пошто и ХСА и БСА садрже само један слободан цистеин, Cys-34, обележавање његовог бочног остатка омогућава испитивање конформационих промена у албумину само са једног места. На слици 18б је приказан 5-МСЛ везан за Cys-34 у БСА. Обележивач 5-МСЛ је према литератури, такође, коришћен за испитивање и ХСА и БСА, али у мањој мери у односу на доксил-стеаринску киселину. Према доступним литературним подацима, 5-МСЛ је употребљен за праћење конформационих промена у албумину индукованих: варирањем температуре [56] и рН [54,55], присуством сурфактанта [58] и интеракцијом са вештачким липидним мембранама [59]. Међутим, подаци дати у литератури о конформационим променама узрокованим мењањем температуре и рН, а проучаваних помоћу 5-МСЛ су непотпуни. Разлог томе је што у овим радовима аутори сугеришу да је боље користити малеимидо-аминоксилне деривате који између аминоксилне и малеимидо групе поседују дуже повезујуће групе, тако да аминоксилна група досеже отвор хидрофобног цепа у којем се налази Cys-34 [54,55,57,121]. За овакве малеимидо-аминоксилне деривате се уопштено сматра да су осетљивији на конформационе промене у албумину, због тога што нису тако ригидно везани за Cys-34, за разлику од обележивача 5-МСЛ. Стога је у овој дисертацији 5-МСЛ коришћен и да би се испитало да ли њиме могу да се детектују суптилне конформационе промене настале везивањем лиганда за албумин.



Слика 18. а) Схематски приказ везивања спинског обележивача 5-МСЛ за слободну сулфхидрилну групу протеина. (Слика је направљена на основу података приказаних у референци [122].) **б)** Приказ Cys-34 у БСА обележеног спинским обележивачем 5-МСЛ (приказан розе бојом). На слици су обележене аминокиселине које се налазе у околини Cys-34: глутамин (Gln-33), пролин (Pro-35), хистидин (His-39) и тирозин (Tyr-84). Молекулски модел везивања 5-МСЛ за БСА је добијен у програму *PuMOL* коришћењем кристалографске структуре БСА преузете са сајта <https://www.rcsb.org/> PDB ID: 4f5s [66]. (Прилагођено из [123].)

3. Материјали и методе

3.1. Хемикалије

Хумани серумски албумин (ХСА, у облику лиофилизованог праха, из којег су уклоњене масне киселине и глобулини), спински обележивачи, 5- и 16-доксил-стеаринска киселина (5-ДС и 16-ДС) и 3-малеимида-проксил (5-МСЛ) су купљени од Sigma-Aldrich (САД). Говеђи серумски албумин (БСА, Конова V фракција (Cohn fraction V), у облику лиофилизованог праха, из којег су уклоњене масне киселине) је купљен од фирме Merck (Немачка). Хемикалије потребне за припремање пуфера (цитратног, фосфатног, карбонатног и трис-хидроксиметиламинометанског (ТРИС)), етанол, водоник-пероксид, калијум-супероксид, аскорбинска киселина, масне киселине (лауринска, миристинска, палмитинска, стеаринска и цис-олеинска киселина) и лекови (ибупрофен, диазепам, варфарин, рамиприл, бромазепам и диклофенак-натријум) су купљени, такође, од Sigma-Aldrich (САД). Све супстанције су биле аналитичке чистоће и коришћене су без икаквог даљег пречишћавања. Сви водени раствори су припремани у дејонизованој Mili-Q води (18 MΩ).

3.2. Припрема узорака хуманог серумског албумина и обележавање доксил-стеаринским обележивачима

Општа процедура припреме узорака је подразумевала најпре растварање обележивача 5-ДС и 16-ДС у етанолу, након чега је одговарајућа запремина овог раствора (10 mM) пренета на дно пластичне микроцентрифушке тубице, а етанол је упарен у вакуумском-концентратору (Eppendorf Concentrator Plus). Затим је у тубицу обележену са ДС додавана одговарајућа запремина раствора ХСА (раствореног у 100 mM фосфатном пуферу рН 7,4, који садржи 0,9 % натријум-хлорида (ПБС, од енглеског *Phosphate Buffered Saline*), осим у случају проучавања утицаја рН и етанола на ХСА, што ће бити детаљније описано), тако да је финална концентрација ХСА у сваком узорку била 0,1 mM. Овако припремљен узорак је

лагано мешан на вортексној мешалици и инкубиран 30 min⁹ на 22 °C (осим у експериментима где је испитиван утицај температуре на конформацију ХСА). Узорци су били тако спремљени да односи [ДС]:[ХСА] буду између 0,5:1 и 6:1.

Након инкубације, 30 µl сваког од узорака (осим у случају када је испитивана растворљивост 5-ДС и 16-ДС у воденим растворима различитих рН вредности, што ће бити детаљније објашњено у поглављу 3.2.5) је увучено у капиларно тefлонско гас-пропусно црево унутрашњег пречника 1 mm (Zeus Industries, САД). Црево је потом савијено на пола и смештено у кварцну кивету, која се поставља у резонатор ЕПР спектрометра.

3.2.1. Оптимизација времена и температуре инкубације ХСА и ДС

У оквиру ових експеримената, испитан је утицај инкубационог времена и температуре на везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА. У тубице са сувим 5-ДС или 16-ДС, додат је 0,1 mM раствор ХСА у 100 mM ПБС-у, тако да се постигну следећи моларни односи [ДС]:[ХСА] – 1:1, 2:1, 3:1 и 6:1. За сваки од ових односа, инкубација је вршена на две температуре – 22 и 37 °C (у воденом купатилу), како би се утврдило да ли је неопходно да се инкубација врши при физиолошким условима (37 °C) или је могуће поједностављење процедуре инкубацијом на 22 °C. Сваки од овако припремљених узорака је сниман на ЕПР спектрометру после 15, 30, 60 и 90 min од мешања ХСА са ДС-ом.

3.2.2. Компетиција између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА

Како би се установило да ли се 5-ДС и 16-ДС везују за иста места у ХСА, урађен је сет експеримената у којима је раствор 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС, рН 7,4) додаван у тубице које су садржале на дну истовремено и 5-ДС и 16-ДС у различитим моларним односима. Узорци су припремани тако да буду постигнути следећи моларни односи [5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] – 1:1:1, 1:2:1, 2:1:1 и 2:2:1. Цела

⁹ Прво си изведени експерименти којима се испитује утицај инкубационог времена на везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА (поглавље 3.2.1), при чему је установљено да је оптимално време инкубације за оба обележивача 30 min (поглавље 4.1.1).

припрема узорка је изведена у складу са процедуром описаном на почетку поглавља 3.2.

3.2.3. Испитивање изложености доксил групе води

Како би се испитало у којој мери су доксил групе 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА изложене води, тј. колико су близу површини ХСА, праћена је кинетика редукције доксил групе аскорбинском киселином. Наиме, $>N-O^{\cdot}$ група у присуству редукционих средстава, као што је аскорбинска киселина се редукује у хидроксиламински облик $>N-OH$, који није парамагнетик, тако да се не може детектовати ЕПР спектроскопијом. Последица редукције доксил групе аскорбинском киселином је опадање интензитета ЕПР сигнала. За потребе овог експеримента 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС, pH 7,4) је обележен са 5-ДС или 16-ДС, тако да је моларни однос [ДС]:[ХСА] био 1:1. Аскорбинска киселина је додата у раствор обележеног ХСА, тако да је њена концентрација била 10 пута већа од концентрације ХСА.

3.2.4. Испитивање утицаја температуре на конформацију ХСА

За испитивање утицаја температуре на конформационе промене ХСА, коришћена су два различита приступа у погледу припреме узорка. Први приступ подразумева мешање раствора ХСА са 5-ДС или 16-ДС, и непосредно након тога загревање на воденом купатилу у трајању од 30 min, након чега се узорак преноси у резонатор ЕПР спектрометра и снима се ЕПР спектар. Други приступ подразумева да се ХСА најпре обележи са ДС обележивачима, инкубира 30 min на 22 °C, а затим загрева 30 min у воденом купатилу на одређеној задатој температури, након чега се снима ЕПР спектар узрока. У оба случаја концентрација ХСА је била 0,1 mM (у 100 mM ПБС, pH 7,4), а [ДС]:[ХСА] моларни однос је био 2:1, док је температура варирана у опсегу 25-75 °C.

3.2.5. Испитивање утицаја рН на конформацију ХСА

Утицај рН на ХСА је најпре испитиван тако што је 0,1 mM раствор ХСА припремљен у различим пуферима концентрације 100 mM (цитратни за рН вредности између 2,0 и 6,0; фосфатни пуфер за област рН 6,5-7,5; ТРИС за 8,0-9,5 и карбонатни за 10,0-11,0; сваки од ових пуфера је садржао и 0,9 % NaCl) додат на дно тубице обележене са 5-ДС или 16-ДС. Моларни однос [ДС]:[ХСА] је у коначном узорку био 2:1. Узорци су према већ описаној процедури инкубирани 30 min, након чега су снимани ЕПР спектри. С обзиром на то да је већ у врло слабо киселој средини уочен нагли пад сигнала ДС везаног за ХСА, испитана је растворљивост 5-ДС и 16-ДС у свим наведеним пуферима на следећи начин: У танку пластичну цевчицу затопљену у пламену са једне стране¹⁰ додат је етанолни раствор 5-ДС или 16-ДС и узорци су остављени на ваздуху ради испаравања етанола. Када је сав етанол испарио, у ове цевчице је додавано по 20 µl наведених пуфера, при чему је концентрација 5-ДС и 16-ДС износила 0,2 mM. Цевчице су затим запушене пластичним чепићима, мешане на вортексној мешалици и остављене да одстоје 30 min пре снимања на ЕПР спектрометру. Из ових експеримената је утврђено да је растворљивост 5-ДС и 16-ДС, између осталог, ограничавајући фактор за везивање ових обележивача за ХСА, тако да су конформационе промене проучаване на узорцима припремљеним модификованом процедуром. Ова процедура подразумева припрему веће количине 0,2 mM раствора ХСА у 0,9 % NaCl, који је додат у тубицу претходно обележену одговарајућом количином 5-ДС или 16-ДС, тако да је моларни однос [ДС]:[ХСА] износио 2:1. рН вредност овог раствора је додатком мале запремине 1 M раствора HCl или NaOH подешен на 7,0. Раствор је мешан на вортексној мешалици и остављен да се инкубира 30 min на 22 °C. Финални узорци за снимање на ЕПР

¹⁰ На овом месту је важно нагласити да је због употребе пламена могло да дође до стварања слободних радикала на дну цевчице. Због тога је најпре цевчица напуњена са 20 µl 100 mM ПБС-а снимљена на ЕПР спектрометру, да би се искључило евентуално постојање слободних радикала и последично ометајућег сигнала у ЕПР спектру. Како пластична цевчица није давала никакав сигнал у ЕПР спектру снимљеном при истим инструменталним параметрима под којима су снимани узорци, настављено је са коришћењем ових цевчица за испитивање растворљивости 5-ДС и 16-ДС при различитим рН вредностима раствора.

спектрометру су припремани мешањем једнаких запремина раствора обележеног ХСА и одговарајућег пуфера (200 mM, 0,9 % NaCl).

3.2.6. Испитивање утицаја етанола на конформацију ХСА

За потребе овог дела истраживања, узорци су такође припремани на два начина. У обе процедуре се мешају једнаке запремине 0,2 mM раствора ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4) и етанол-ПБС смеше (концентрација етанола у овим смешама се креће у опсегу 2-100 % v/v). У првој процедури раствор ХСА помешан са етанолом се додаје на дно тубице обележене са 5-ДС или 16-ДС, након чега се узорак инкубира 30 min на 22 °C и снима на ЕПР спектрометру. У другој процедури 0,2 mM раствор ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4) је прво обележен са одговарајућом количином 5-ДС или 16-ДС инкубацијом 30 min на 22 °C, па је тек онда додавана одговарајућа смеша етанол-ПБС. У оба случаја моларни однос [ДС]:[ХСА] је износио 2:1.

3.2.7. Испитивање утицаја везивања лиганада за ХСА

У оквиру ових експеримената, масне киселине (лауринска, миристинска, палмитинска, стеаринска и цис-олеинска) и лекови (ибупрофен, диазепам, варфарин, рамиприл, бромазепам и диклофенак-натријум) су прво везивани за ХСА, па је потом ХСА обележен са 5-ДС или 16-ДС према већ описаној процедури. Везивање масних киселина и лекова је вршено тако што су прво различите запремине етанолних раствора ових лиганада наношене на дно тубица, а етанол је упарен на вакуумском концентратору. Потом је додат 0,1 mM раствор ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4) у тубице са лековима и масним киселинама. Узорци су мешани на вортексној мешалици и остављени да се инкубирају 10 h.

У експериментима са масним киселинама моларни односи [МК]:[ХСА] су износили 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 и 8:1, а [ДС]:[ХСА] је износио 1:1.

У случају лекова, моларни однос [ДС]:[ХСА] је био константан и износио је 2:1, а вариран је однос [лек]:[ХСА] (0:1, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1).

3.2.8. Испитивање утицаја реактивних кисеоничних врста на ХСА

За испитивање утицаја реактивних кисеоничних врста (РОС, од енглеског *Reactive Oxygen Species*) на ХСА, прво је већа количина 0,1 mM раствора ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4) помешана са 30 % H₂O₂ или чврстим KO₂, тако да су моларни односи [H₂O₂]:[ХСА] и [KO₂]:[ХСА] били 1:1. Овако припремљени раствори су остављени 24 h да се инкубирају, па су тек онда обележавани и инкубирани са 5-ДС или 16-ДС према описаној процедури. Моларни однос [ДС]:[ХСА] је вариран и износио је 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1 и 6:1. Ради поређења припремљени су и снимљени узорци са истим односима [ДС]:[ХСА], али ХСА није био претходно инкубиран са РОС.

3.3. Припрема узорака говеђег серумског албумина и обележавање 3-малеимида-проксилом

У свим експериментима (осим у случају испитивања утицаја РОС на БСА) 0,6 mM БСА је прво растворен у 10 mM фосфатном пуферу, pH 7,4, након чега је обележаван са 5-МСЛ. При испитивању утицаја РОС на БСА, прво је припремљен 0,6 mM раствор БСА у 50 mM фосфатном пуферу (pH 7,4) који је 24 h инкубиран са одговарајућом количином H₂O₂ или KO₂, тако да је концентрација ових једињења у узорку била, такође, 0,6 mM. БСА је у овом случају обележаван тек по завршетку инкубације са РОС. Протокол за обележавање, уклањање слободног 5-МСЛ и концентровање, је исти као и за остале узорке, с једином разликом да је при пречишћавању ових узорака коришћен 50 mM фосфатни пуфер за уравнотежавање и елуирање хроматографске колоне.

Обележавање БСА са 5-МСЛ је вршено према даље описаној процедури. Одговарајућа запремина 100 mM раствора 5-МСЛ у етанолу је одмерена и пренета у микроцентрифушку тубицу, а потом је етанол сушен у вакуумском концентратору. Када је сав етанол испарио, на суви 5-МСЛ је додат претходно припремљен раствор БСА у толикој количини да је концентрација 5-МСЛ била пет пута већа од концентрације БСА [59]. Смеша је лагано мешана на магнетној мешалици наредна 24 h на 4 °C. Невезани 5-МСЛ је уклоњен коришћењем колоне

за одсољавање (за гел-филтрацију) чија је гранична ексклузивна релативна молекулска маса 5000 Da [34] (Sephadex PD MiniTrap G-25, GE Healthcare, Шведска), применом гравитационог протокола који је прописао произвођач. Овај протокол подразумева најпре припрему колоне, тј. уравнотежавање колоне фосфатним пуфером (pH 7,4, 50 mM при испитивању утицаја РОС и 10 mM за све остале узорке), осим у случају припреме раствора БСА за испитивање утицаја pH, када је уравнотежавање и елуирање колоне вршено дејонизованом Mili-Q водом уместо фосфатним пуфером. При уравнотежавању, у колону се додаје око 2,7 ml фосфатног пуфера (односно Mili-Q воде) и пусти се да пуфер (вода) исцури, па се исти поступак понавља још два пута. По уравнотежавању, у колону је додато 0,5 ml раствора БСА обележеног са 5-МСЛ и узорак је пуштен да се упије у сефарозно пуњење колоне, док је раствор који је излазио из колоне скупљан у епрувету и одбачен. Када је раствор престао да излази из колоне, под колону је постављена тубица за скупљање раствора БСА. У колону је додат 1,0 ml фосфатног пуфера (односно Mili-Q воде) и елуат је сакупљен у тубицу.

Након уклањања невезаног обележивача, раствор БСА обележен са 5-МСЛ је концентрован центрифугирањем при 14000 x g у трајању од 5 min (према протоколу који препоручује произвођач) коришћењем Amicon Ultra центрифугалних филтера (Merck Milipore Ltd., Ирска), чија је номинална гранична молекулска маса 3000 Da. Концентрација БСА после концентровања је одређена спектрофотометријски на Thermo Scientific Evolution 220 УВ-Вис спектрофотометру, мерењем апсорбације на 278 nm [124] и подешена је на 0,3 mM додавањем или фосфатног пуфера (pH 7,4, 10 или 50 mM) или Mili-Q воде (за узорак на којем је проучаван утицај варирања pH).

Финални узорци су припремани тако што су помешане једнаке запремине раствора обележеног БСА и одговарајућег пуфера тако да је у свим узорцима коначна концентрација БСА била 0,15 mM. За проучавање утицаја температуре, везивања лиганда и РОС на конформационе промене БСА, у 0,3 mM раствор обележеног БСА је додаван фосфатни пуфер (pH 7,4), и то 50 mM за испитивање утицаја РОС и 100 mM за све остале узорке. Да би се испитивале конформационе промене индуковане температуром, овако припремљени узорци су загревани у воденом купатилу у температурском интервалу 25-75 °C. При испитивању утицаја

везивања лиганада (коришћене су исте масне киселине и лекови као и у случају ХСА, видети поглавље 3.2.7), 0,15 mM обележени БСА је додат у тубице које су на дну садржале одговарајућу количину масне киселине или лека (процедура наношења масних киселина и лекова у тубицу је већ описана у поглављу 3.2.7) и узорци су инкубирани 10 h. Количине раствора БСА и лиганада су биле такве да су постигнути [лиганд]:[БСА] моларни односи били 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 и додатно још 7:1 за масне киселине. У случају БСА третираног са РОС, после разблажења узорака до 0,15 mM БСА, није било даљих корака припреме, већ је узорак одмах сниман на ЕПР спектрометру.

Утицај pH је испитиван на узорцима који су добијени мешањем 0,3 mM раствора обележеног БСА са 100 mM пуферима различитих pH вредности (видети поглавље 3.2.5. за податке о томе који је пуфер коришћен за коју област pH). Да би се испитао утицај етанола, узорци су припремљени мешањем 0,3 mM раствора обележеног БСА са етанол-пуфер смешама у којима је етанол био присутан у различитим концентрацијама (концентрација етанола се кретала у опсегу 2-100 % v/v, а коришћени пуфер је био 100 mM фосфатни, pH 7,4).

По 30 μ l сваког од узорака је увучено у капиларно гас-пропусно тефлонско црево, које је потом савијено на пола, смештено у кварцну капилару, која је потом постављена у резонатор ЕПР спектрометра.

3.4. Мерења на ЕПР спектрометру

Сва мерења су вршена на Bruker Elexsys II E540 ЕПР спектрометру чија је фреквенција микроталаса у X-области (9,85 GHz). Мерења су вршена на собној температури, осим у случају када је праћен утицај температуре на ХСА и БСА (у случају ХСА за узорке чија је припрема описана у поглављу 3.2.4), када је резонатор ЕПР спектрометра загреван помоћу Bruker ER4131VT N₂ температурског контролера. У свим експериментима су коришћени следећи инструментални параметри: центар поља 3510 G, модулациона фреквенција 100 kHz, модулациона амплитуда 2 G, снага микроталасног зрачења 10 mW. Спектри су снимљени и анализирани коришћењем Bruker Херг софтверског пакета.

3.5. Симулације ЕПР спектра

Експериментални ЕПР спектри су разложени на компоненте коришћењем два различита софтверска пакета. За разлагње ЕПР спектра узорака ХСА обележених са 5-ДС или 16-ДС коришћен је софтверски пакет EPRSIM-C [125,126], док су спектри добијени снимањем БСА обележеног са 5-МСЛ симулирани коришћењем EPRSIM-C и SimLabel¹¹ [128] софтверских пакета.

Спектри ХСА обележеног са 5-ДС и 16-ДС су разложени на пет спектралних компонената, коришћењем пет различитих модела доступних у овом софтверском пакету. Ови модели узимају у обзир: изотропну брзу ротацију аминоксилних обележивача (ISO компонента), изотропну измену између два обележивача (LLE компонента, скраћено од енглеског *Label-Label Exchange*), и обележивача и агенса који изазива ширење ЕПР линија (LBE компонента, скраћено од енглеског *Label-Broadening agent Exchange*), анизотропно кретање са потпуним (MEM компонента) и делимичним усредњавањем свих ротација око главне молекулске осе обележивача (MES компонента). Симулација је прво вршена на ЕПР спектру узорака ХСА обележеног са 5-ДС или 16-ДС, у 100 mM ПБС-у (pH 7,4) у којима је моларни однос [ДС]:[ХСА] био 1:1, све док није достигнута задовољавајућа доброта фита (фактор $\chi^2 \leq 5$). Излазни параметри ове симулације су коришћени као почетни параметри за све узорке ДС/ХСА у 100 mM ПБС-у (pH 7,4) у којима су 5-ДС и 16-ДС били присутни у различитим [ДС]:[ХСА] моларним односима. Излазни параметри ових симулација добијени за одређен однос [ДС]:[ХСА] су даље коришћени као почетни параметри за симулацију ЕПР спектра свих узорака у којима су ДС и ХСА били присутни у том односу.

За разлику од ДС/ХСА, спектри БСА обележеног са 5-МСЛ су разлагани само на две компоненте – јако везану (JB) и слабо везану (CB). Симулације ових

¹¹ SimLabel је програм који користи “chili” функцију програма EasySpin [127], базираном на MATLAB софтверском пакету. EasySpin је софтверски пакет који се користи за симулацију широког дијапазона анизотропних и изотропних ЕПР спектра система са различитим вредностима и бројем електронских и нуклеарних спинова. Поменута “chili” функција служи за симулацију ЕПР спектра спинских система који споро ротирају.

спектра у оба софтверска пакета су прво урађене на спектру 0,15 mM БСА обележеног са 5-МСЛ у 50 mM фосфатном пуферу (pH 7,4). Излазни параметри ове симулације су коришћени као почетни параметри за симулације свих осталих спектра БСА обележеног са 5-МСЛ. За симулације које су вршене у софтверском пакету SimLabel, оптималне вредности параметара **A**- и **g**-тензора су дате у табели 1. Симулације свих других спектра узорака 5-МСЛ/БСА су извршене варирањем A_{zz} , ротационих корелационих времена (τ_c) и удела обеју компонената (N_{JV} и N_{SV} ¹²). Ротациона корелациона времена обеју компонената одређена у овим симулацијама су коришћена за праћење конформационих промена БСА које су последица утицаја РОС, присуства етанола, везивања лиганда, варирања температуре и pH. У EPRSIM-C софтверском пакету, експериментални спектри су разлагани коришћењем ISO и MES¹³ модела, који редом одговарају JB и СВ компоненти. Након утврђивања почетних параметара, даље симулације су спровођене варирањем ротационих корелационих времена и удела обеју компонената. У случају проучавања БСА, EPRSIM-C је коришћен искључиво ради праћења промена удела JB и СВ компонената при загревању узорака 5-МСЛ/БСА конјугата и поређења ових резултата (N_{JV} и N_{SV}) са онима који се добијају симулацијама у SimLabel пакету. Средње вредности и границе грешака свих коришћених параметара су процењене на основу резултата три узастопне симулације (које почињу од истих почетних параметара) извршене на једном истом ЕПР спектру.

Табела 1. Вредности елемената **A**- и **g**-тензора ЕПР спектралних компонената које одговарају обележивачу 5-МСЛ јако (JB) и слабо (СВ) везаном за БСА. Ове вредности су коришћене као почетни параметри при симулацији ЕПР спектра БСА обележеног са 5-МСЛ у SimLabel софтверском пакету.

Компонента	A_{xx} [G]	A_{yy} [G]	A_{zz} [G]	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
JB	5,0	5,0	36,1	2,0090	2,0050	2,0018
СВ	5,0	5,0	37,0	2,0074	2,0054	2,0036

¹² Удели компонената имају вредност између 0 и 1 и представљају допринос двоструког интеграла неке спектралне компоненте укупном двоструком интегралу одређеном за цео ЕПР спектар.

¹³ MES модел је изабран због тога што је, према сугестијама аутора овог програма, MES модел дизајниран баш за обележиваче који се ковалентно везују за циљано место у протеину [125,126].

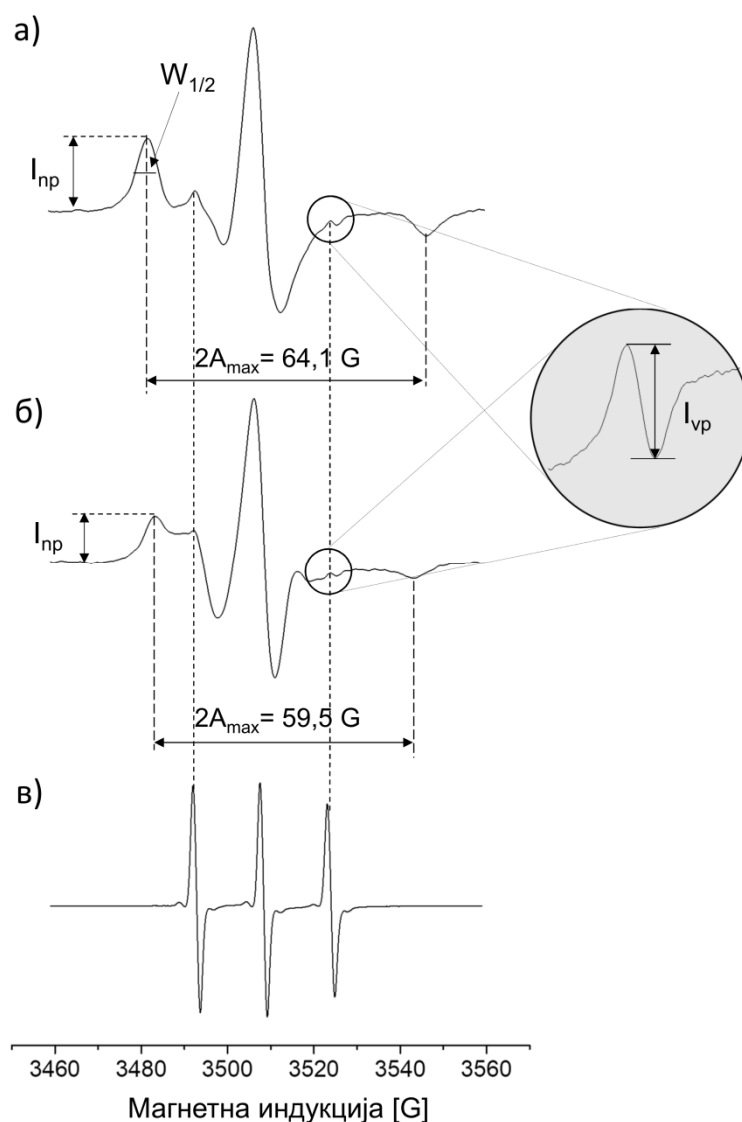
4. Резултати и дискусија

Резултати добијени у оквиру ове дисертације су подељени у три главне целине. У оквиру прве целине (поглавље 4.1) приказани су резултати који се односе на оптимизацију услова инкубације доксил-стеаринских (ДС) обележивача са хуманим серумским албумином (ХСА) и карактеризације места везивања ДС за ХСА. У овом делу дисертације испитана је и конкуренција између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА, као и близина доксил групе ДС обележивача (везаног за ХСА) површини ХСА. Друга целина (поглавље 4.2) приказује детаљну анализу места везивања 3-малеимидо-проксила (5-МСЛ) за говеђи серумски албумин (БСА). Трећа целина (поглавље 4.3) уједно представља главни део ове дисертације, и приказује како варирање температуре и рН, додаток етанола, везивање масних киселина и лекова, и оксидативна оштећења утичу на конформацију ХСА и БСА, при чему су конформационе промене ХСА проучаване помоћу ДС обележивача, док је у те сврхе БСА обележаван са 5-МСЛ.

4.1. Везивање доксил-стеаринских обележивача за хумани серумски албумин

Обележавањем ХСА са 5-ДС и 16-ДС добијају се ЕПР спектри (слика 19) какви се очекују према литератури [19,23–32,34,36]. Поређењем спектра 16-ДС раствореног у пуферу (100 mM ПБС, рН 7,4, Слика 19в), 5-ДС/ХСА (слика 19а) и 16-ДС/ХСА комплекса (слика 19б) уочава се да сва три спектра садрже три оштра пика (на слици су повезани испрекиданим линијама), која потичу од невезаног обележивача. С обзиром на то да су ови спектри добијени при моларном односу $[ДС]:[ХСА] = 1:1$, закључује се да чак и при ниским односима $[ДС]:[ХСА]$ постоји веома мала количина невезаног обележивача у равнотежи са везаним. Количина невезаног обележивача се може проценити мерењем амплитуде трећег пика који потиче од слободног обележивача (тзв. пика на високом пољу), која је обележена на слици 19 као I_{vp} [27]. Наравно, овај начин процене количине невезаног обележивача је применљив само уколико се ширина овог пика не мења значајно (погледати поглавље 2.2.3). Међутим, при конформационим променама протеина

може доћи и до промене вискозности раствора услед структурних промена у протеину, што ће утицати на ширину овог пика, као и целог ЕПР спектра [2,18,117]. У таквим случајевима, да би се проценила количина невезаног обележивача, рађене су симулације ЕПР спектра, чиме су добијене информације о доприносу невезане компоненте двоструком интегралу укупног спектра (N_{NV}). Са друге стране, на сличан начин, количина везаног обележивача у првој апроксимацији може да се процени на основу висине пика на ниском пољу, која је на слици 19 означена са I_{np} , у случају да се ширина на полувисини овог пика ($W_{1/2}$), као и ширина целог спектра ($2A_{max}$) не мењају значајно [27].



Слика 19. ЕПР спектри обележивача 5-ДС (а) и 16-ДС (б) везаних за ХСА и ЕПР спектар 16-ДС у воденом раствору (в). Оба узорка комплекса ДС/ХСА су садржала 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4), а однос [ДС]:[ХСА] је био 1:1. ЕПР спектар слободног 16-ДС је снимљен на узорку 0,2 mM 16-ДС у 100 mM ПБС-у, pH 7,4. Спектри су ради боље прегледности приказани на различитим интензитетским скалама: спектар (а) је увећан 1,9 пута у односу на спектар (б), а спектар (в) је 17,6 пута умањен у односу на спектар (б). Висина пика на ниском пољу је обележена са I_{np} и користи се за процену количине везаног обележивача, а интензитет пика на високом пољу, I_{vp} , се користи као мера количине невезаног обележивача. Са $2A_{max}$ је означен параметар максималног хиперфиног цепања, тј. ширина спектра, а $W_{1/2}$ представља ширину на полувисини пика на ниском пољу.

Са слике 19 се, такође, може уочити да је ширина спектра, $2A_{max}$, већа за 5-ДС/ХСА комплекс у односу на 16-ДС/ХСА. Такав резултат је добијен и у

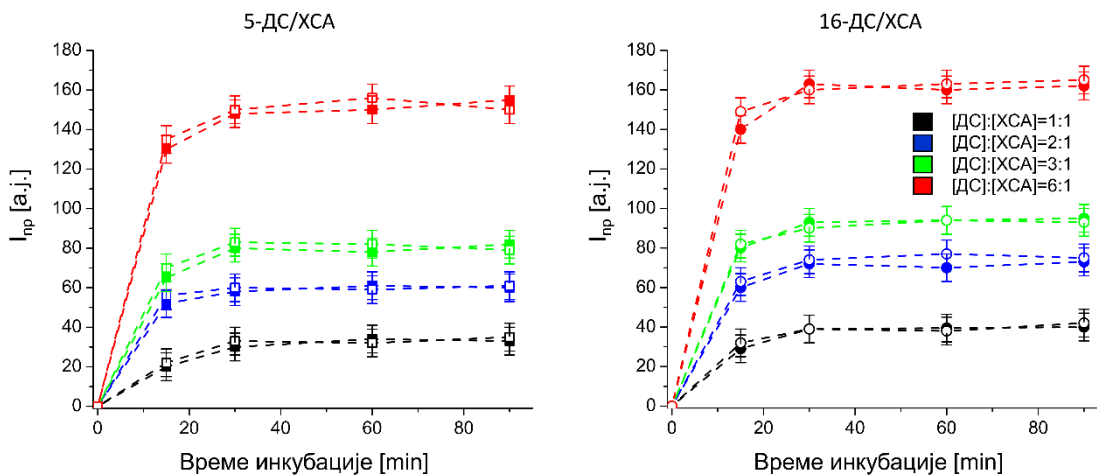
литературним изворима [23,26,27,31,34,36]. Оваква разлика у вредностима $2A_{\max}$ између 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса је уочена и при вишим моларним односима [ДС]:[ХСА]. Стога, на основу вредности $2A_{\max}$ закључује се да је у просеку доскил група 5-ДС јаче имобилисана у ХСА у односу на 16-ДС. Овакав закључак је подржан резултатима других аутора, који су показали да је ротационо корелационо време веће за 5-ДС/ХСА у односу на 16-ДС/ХСА комплекс [31,36]. 5-ДС и 16-ДС могу да се вежу у ХСА на више места која имају различите карактеристике у погледу везивања о чему ће бити више речи у поглављу 4.1.2.

4.1.1. Оптимизација инкубационих услова за везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА

У литератури постоје веома хетерогени подаци по питању услова инкубације, ради постизања максималног везивања доксил-стеарата за албумин (и ХСА и БСА). Неке процедуре подразумевају да се доксил-стеарати растворени у различитим органским растварачима додају у раствор албумина и инкубирају само 1-5 min [27,30,32]. У другим случајевима доксил-стеарати растворени у органским растварачима се наносе на зидове епрувете, органски растварач се оставља да испари, а затим се додаје албумин и узорак инкубира 1-6 h [19,24,26,36]. Температура инкубације је у овим процедурама такође врло различита и креће се у опсегу 4-37 °C [19,24,26,27,30,32,36,46]. Из тог разлога је било неопходно да се одреде оптимални услови инкубације, тј. да се утврди при ком инкубационом времену се постиже максимално везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА и да ли се обележивач више везује за ХСА при физиолошкој температури у односу на собну температуру.

На слици 20 је приказана промена количине везаног 5-ДС или 16-ДС (процењена преко I_{np}) са инкубационим временом на две температуре (22 и 37 °C) и при четири различита моларна односа [ДС]:[ХСА]. На основу ових података закључује се да се максимално везивање оба обележивача за ХСА, при свим испитиваним односима, на обе температуре, догађа у року од 30 min. Осим тога, лако се уочава да при свим моларним односима [ДС]:[ХСА] нема разлике у количини везаног обележивача, ако се узорак инкубира на 22 °C уместо на 37 °C.

На основу ових резултата установљена је процедура која подразумева инкубацију узорка у трајању од 30 min на 22 °C, тако да су узорци надаље припремани на овај начин, како је то већ детаљно описано у поглављу 3.2.



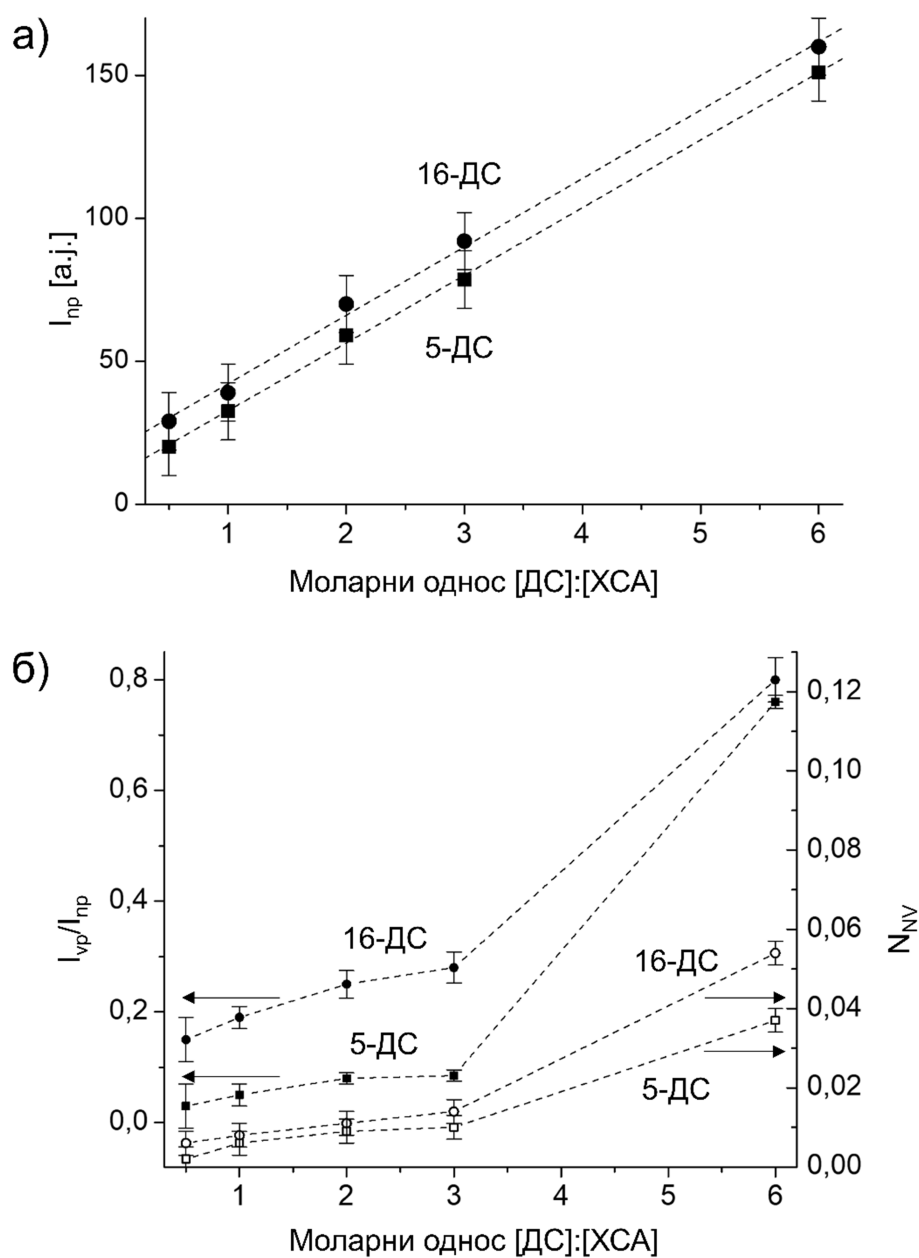
Слика 20. Зависност висине ЕПР пика на ниском пољу (I_{np} , приказана у арбитарним ЕПР јединицама) од инкубационог времена, праћена при различитим односима [ДС]:[ХСА]. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4) и инкубирани су на две различите температуре: 22 °C (пуни симболи) и 37 °C (празни симболи). Сви ЕПР спектри су снимљени при истим инструменталним параметрима.

4.1.2. Утицај моларног односа [ДС]:[ХСА] на везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА

На Слици 21а представљена је зависност I_{np} , као мере везаног обележивача, у функцији моларних односа [ДС]:[ХСА]. На основу података приказаних на овој слици закључује се да количина везаног обележивача линеарно расте са повећањем моларног односа [ДС]:[ХСА] и не показује сатурацију у опсегу моларних односа од 0,5:1 до 6:1. При тумачењу ових резултата треба имати на уму да то што је висина пика (приказана у арбитарним ЕПР јединицама, а.ј.) на ниском пољу већа за 16-ДС у односу на 5-ДС, не значи да је већа количина 16-ДС везана за ХСА у поређењу са 5-ДС. Наиме, како је већ наведено у поглављу 2.2.3, висине (или амплитуде) пикова не зависе само од концентрације обележивача, већ и од ширина пикова, које пак зависе од брзине

ротације обележивача. Како је већ објашњено на почетку поглавља 4.1, 16-ДС везан за ХСА показује бржу ротацију од 5-ДС, па су због тога вредности I_{np} за 16-ДС/ХСА комплекс веће него за случај 5-ДС/ХСА. Да би се одредила тачна количина везаног обележивача (приказана у јединицама концентрације), требало би да се рачуна дупли интеграл ЕПР спектра ДС/ХСА комплекса и да се његове вредности пореде са дуплим интегралима одређеним за стандарде (ова процедура такође уноси значајне грешке у коначни резултат). Међутим, у контексту ове дисертације, апсолутна количина везаног обележивача није од нарочитог значаја, већ је било важно испитати како се мењају поједини пикови ЕПР спектра са варирањем моларних односа [ДС]:[ХСА]. За те потребе I_{np} даје у првој апроксимацији задовољавајуће резултате [27]. Са повећањем моларних односа [ДС]:[ХСА], као што се види са слике 21б, повећава се и однос I_{vp}/I_{np} , а самим тим и количина невезаног обележивача. И овде треба истаћи да односи интензитета ових пикова нису квантитативна мера односа количина везаног и невезаног обележивача (НВ), већ само илуструју тренд раста количине невезаног обележивача. На основу израчунатог односа I_{vp}/I_{np} представљеног на слици 21б може да изгледа да је при односу [ДС]:[ХСА] = 6:1 количина невезаног обележивача веома велика. Међутим, количина невезаног обележивача израчуната поређењем I_{vp} (измереног са ЕПР спектра за ДС/ХСА комплекс) са I_{vp} измереним за ДС у воденом раствору познате концентрације, је износила свега ~ 3 и 4% за 5-ДС и 16-ДС, редом¹⁴. Симулацијама ЕПР спектра ДС/ХСА комплекса снимљених за различите моларне односе [ДС]:[ХСА] процењени су удели невезане компоненте, N_{NV} , у укупном спектру. Ови резултати су, поређења ради, такође приказани на слици 21б. Као што се види са ове слике, резултати приказани за однос I_{vp}/I_{np} и N_{NV} су у доброј сагласности и показују тренд раста невезане компоненте са повећањем моларног односа [ДС]:[ХСА]. Овакви резултати се, такође, слажу са подацима у литератури добијеним за везивање различитих доксил-стеарата за ХСА [25] и БСА [30].

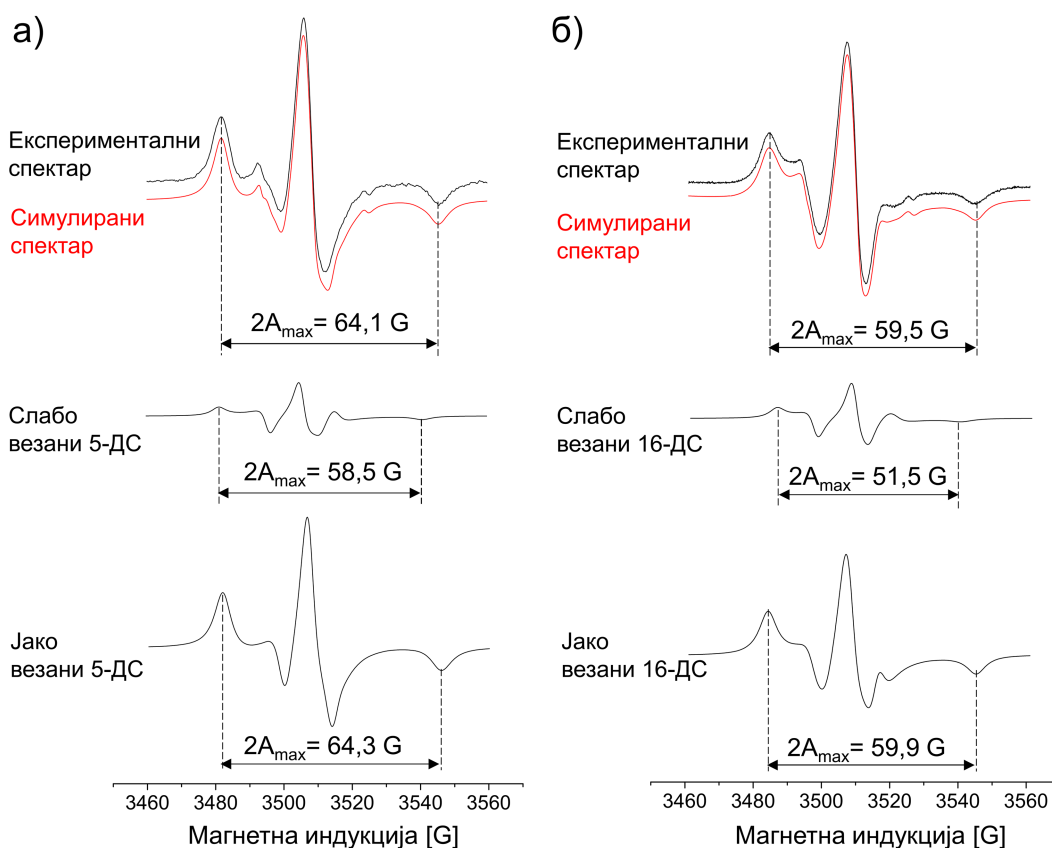
¹⁴ Одређивањем концентрације невезаног обележивача на овај начин, уноси се грешка која потиче од различитих вискозности раствора у којем је ДС везан за ХСА и оног где се налази слободан у пуферу.



Слика 21. а) Зависност висине ЕПР пика на ниском пољу, I_{np} (приказане у арбитрарним јединицама, а.ј.), од [ДС]:[ХСА] моларног односа. **б)** Зависност односа висина ЕПР пикова на ниском и високом пољу, I_{vp}/I_{np} (лева у-оса), и удела неvezане компоненте добијених симулацијама, N_{Nv} (десна у-оса), од [ДС]:[ХСА] моларног односа. Стрелицама је означено која крива приказује коју зависност. Овим графиком је приказан тренд раста количине неvezаног обележивача са порастом моларног односа [ДС]:[ХСА]. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА растворен у 100 mM ПБС-у, pH 7,4. (Слика представља властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [129].)

Из литературе је познато да се чак и при ниским моларним односима [МК]:[ХСА], масне киселине везују истовремено за неколико места на албумину

[34,130,131]. То такође значи да се при везивању сваког новог молекула масне киселине за албумин не попуњава прво само једно место, па тек када је оно у потпуности попуњено почиње попуњавање наредног. Напротив, неколико студија је показало да осим што се масне киселине истовремено дистрибуирају на неколико места, такође могу релативно брзо да се крећу унутар албумина и измењују места [24,34,130,131]. Показано је да се ЕПР сигнали који потичу од 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА [24,36] или БСА [36] састоје из две компоненте, које одговарају јако везаном (JB) и слабо везаном (CB) обележивачу. У каснијим студијама у којима је везивање 16-ДС за плазму/серум пацијената коришћено за дијагностику различитих болести, управо су удели JB, CB и HB компоненте израчунати симулацијама и коришћени даље као улазни параметри за класификацију помоћу различитих врста статистичке анализе [47–50]. Стога су, ради анализе података, ЕПР спектри 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса разложени на пет компонената симулацијама у софтверском пакету EPRSIM-C [125,126] процедуром која је детаљно објашњена у поглављу 3.5. Две од поменутих пет компонената, које се односе на анизотропну ротацију аминоксилних обележивача (MES и MEM), дају укупан допринос од преко 90 % и на основу ширина спектра, $2A_{\max}$, означене су као JB и CB, при чему је вредност $2A_{\max}$ већа за JB, него за CB компоненту. На слици 22 су ради илустрације приказани резултати симулације ЕПР спектра за узорке ДС/ХСА комплекса моларног односа [ДС]:[ХСА] = 1:1, у 100 mM ПБС-у, pH 7,4 на 22 °C. Са слике 22 се види да су вредности $2A_{\max}$ за 5-ДС/ХСА комплекс веће у односу на 16-ДС/ХСА комплекс не само за укупан спектар, већ и за појединачне компоненте. Из тога се може закључити да су и JB и CB компонента јаче имобилисане у 5-ДС/ХСА комплексу у поређењу са 16-ДС/ХСА комплексом. Осим тога, може се приметити да је ширина спектра, $2A_{\max}$, за CB компоненту 16-ДС/ХСА комплекса значајно мања у поређењу са осталим компонентама приказаним на слици 22. То значи да доксил групе 16-ДС молекула од којих потиче ова компонента поседују релативно велику мобилност. Овакав резултат указује на то да доксил група извесног броја 16-ДС молекула излази из унутрашњости хидрофобног цепа и пролази кроз површину ХСА [19–21,26,34].



Слика 22. Експериментални и симулирани спектри: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекса и спектралне компоненте које одговарају слабо (СВ) и јако везаном (ЈВ) обележивачу. Симулације су урађене на експерименталним ЕПР спектрима 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса снимљеним на 22 °C. У овим узорцима је ХСА растворен у 100 mM ПБС-у (pH 7,4), а моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 1:1.

Удели ЈВ и СВ (N_{JV} и N_{SV} редом) компонената у укупном симулираном ЕПР спектру за различите [ДС]:[ХСА] односе су дати у табели 2. На основу вредности у табели 2 лако се уочава да се N_{JV} , смањује, а N_{SV} расте са повећањем моларног односа [ДС]:[ХСА]. На основу оваквих резултата може се закључити да при повећању броја молекула ДС-а везаних за молекул ХСА, молекули обележивача у великој мери прво заузимају места јаког везивања. Удели приказани у табели 2 показују релативно добро слагање са литературним подацима за 16-ДС/ХСА комплекс [24]. У овом раду за моларни однос [16-ДС]:[ХСА] = 1,8:1 на 20 °C N_{JV} је износио 0,86, а N_{SV} 0,14. Разлика између ових литературних података и резултата приказаних у табели 2 за однос [16-ДС]:[ХСА]

= 2:1 (који је најприближнији), највероватније потиче од тога што је у наведеном раду спектар разлаган само на две компоненте (JB и CB), док су за потребе ове дисертације спектри разлагани на пет компонената, од којих четири дају допринос од 99,9 %¹⁵ - мицела (дата моделом LLE), невезани (дат моделом ISO; удели су дати на Слици 19б), јако и слабо везани обележивач.

Табела 2. Удели јако везане, N_{JV} , и слабо везане компоненте, N_{SV} , у укупном симулираном ЕПР спектру 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса при различитим моларним односима [ДС]:[ХСА]. ХСА је у сваком узорку био растворен у 100 mM ПБС-у (pH 7,4), а концентрација је износила 0,1 mM. Сви ЕПР спектри су снимани на 22 °C.

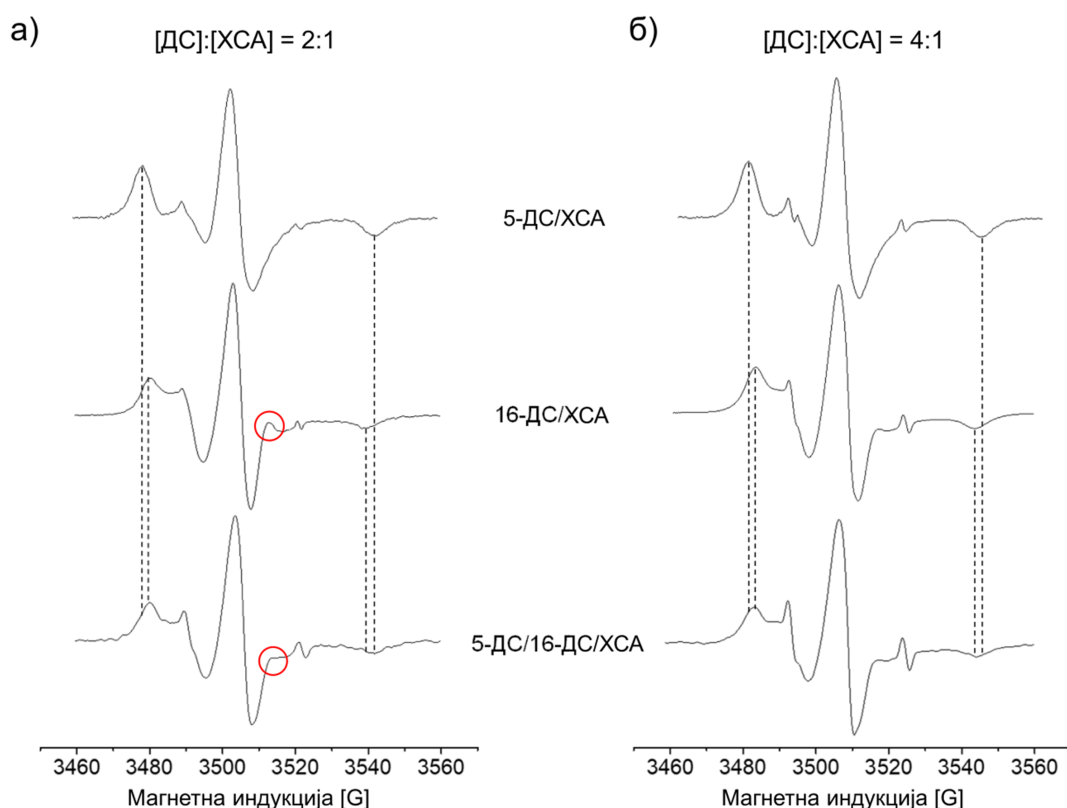
[ДС]:[ХСА]	5-ДС		16-ДС	
	N_{JV}	N_{SV}	N_{JV}	N_{SV}
0,5	$0,81 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
1	$0,82 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
2	$0,81 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
3	$0,77 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$
6	$0,70 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$

*Подаци из табеле представљају властите резултате прилагођене из рада аутора дисертације [129].

4.1.3. Компетиција између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА

Како би се утврдило да ли се 5-ДС и 16-ДС везују за иста места на ХСА, урађени су експерименти у којима је ХСА инкубиран са смешама ова два обележивача. Испитивање конкуренције између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА је вршено на узорцима који су садржали различите [5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] моларне односе - 1:1:1, 1:2:1, 2:1:1 и 2:2:1. Са слике 23 може се уочити да је при оба изабрана моларна односа [ДС]:[ХСА], 2:1 и 4:1, пик невезаног обележивача већи на ЕПР спектрима смеша 5-ДС и 16-ДС, него на спектрима појединачних обележивача, што ће бити касније објашњено.

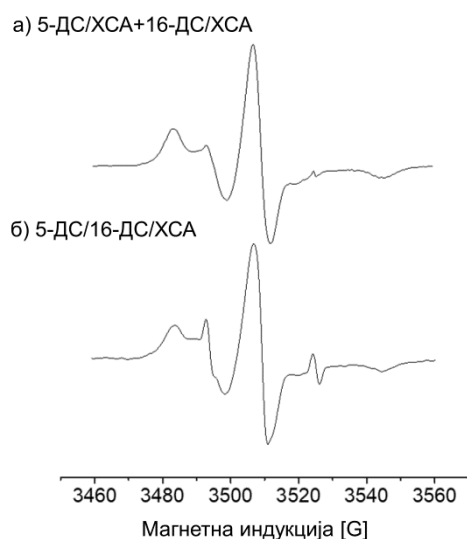
¹⁵ Компонента која се односи на изотропно ширење услед интеракције између обележивача и других парамагнетних агенаса, према резултатима симулација даје удео 0,001, што је и очекивано, с обзиром на то да такви агенси нису били присутни у узорцима.



Слика 23. ЕПР спектри индивидуалних обележивача (два горња спектра на сликама **а** и **б**) и смеше обележивача везаних за ХСА при два моларна односа $[ДС]:[ХСА] = 2:1$ (**а**) и $4:1$ (**б**). Спектри смеше обележивача везаних за ХСА су добијени при моларним односима $[5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] 1:1:1$ (**а**) и $2:2:1$ (**б**). Црвеним кружићем је означен „пик“ који је карактеристичан за 16-ДС/ХСА комплекс, а не постоји у 5-ДС/ХСА комплексу. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА растворен у 100 mM ПБС-у, pH 7,4.

С обзиром на то да се и 5-ДС и 16-ДС везују за ХСА на два типа места и да се спектралне компоненте ЈВ и СВ међусобно разликују за ова два обележивача, симулације у овом случају нису применљиве за одређивање доприноса везаног 5-ДС, односно 16-ДС. Са друге стране, одређивање доприноса појединачних обележивача ЕПР спектру смеше је додатно компликовано и због тога што ЕПР спектар смеше не представља једноставан збир спектра појединачних обележивача везаних за ХСА. На пример, ЕПР спектар (приказан на слици 24) добијен снимањем узорка у којем је моларни однос $[5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА]$ био $2:2:1$ се значајно разликује од збира спектра појединачних 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса у којима је $[ДС]:[ХСА]$ моларни однос био $2:1$. Због свих

наведених препрека у анализи спектра смеше 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА, спектри су проучавани са квалитативне стране, тј. посматрани су облици и ширине спектра ($2A_{\max}$). Само посматрањем облика спектра, може се уочити да према неким карактеристикама („пиковима“ који се појављују у спектрима 16-ДС/ХСА, а не постоје у спектрима 5-ДС/ХСА комплекса; на слици 23 ови „пикови“ су означени црвеним кругом), спектар смеше више личи на спектар 16-ДС/ХСА, него 5-ДС/ХСА комплекса. У прилог томе говоре и подаци о $2A_{\max}$, који су сумирани у табели 3. Наиме, може се приметити да за случајеве смеше у којима су 5-ДС и 16-ДС присутни у еквимоларним односима (за моларне односе [5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] 1:1:1 и 2:2:1) вредности $2A_{\max}$ су ближе вредностима за 16-ДС/ХСА. Вредности $2A_{\max}$ смеше и 16-ДС/ХСА су, такође, блиске када је присутна већа количина 16-ДС у смеси (за моларни однос [5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] 1:2:1). Насупрот томе, када у смеси има више 5-ДС (моларни однос [5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] 2:1:1), $2A_{\max}$ се приближава вредностима добијеним за 5-ДС/ХСА комплекс. У литератури је проучавана конкуренција појединачних доксил-стеарата, 5-ДС, 12-ДС (12-доксил-стеаринска киселина) и 16-ДС са необележеном стеаринском киселином при везивању за БСА [30]. На основу експеримената, аутори овог рада су закључили да се доксил-стеарати уграђују у БСА на места везивања „обичних“, необележених масних киселина. Из тога се може закључити да се наведени различити доксил-стеарати везују за иста места на албумину, тако да је конкуренција између ових обележивача могућа. Узимајући у обзир вредности $2A_{\max}$, као и то да је облик спектра смеше много сличнији спектрима 16-ДС/ХСА комплекса, него спектрима 5-ДС/ХСА, може се закључити да се 16-ДС везује са већим афинитетом за ХСА, него 5-ДС у случају када се оба обележивача истовремено инкубирају са ХСА. Ови резултати показују добро слагање са константама афинитета које су израчунате у литератури за везивање 5-ДС и 16-ДС за БСА и ХСА [30,31]. Према литературним изворима, константе афинитета 16-ДС за примарна места везивања су за ред величине веће него за 5-ДС. Везивање 5-ДС са нижим афинитетом за ХСА и БСА се приписује близини доксил групе карбоксилној глави стеаринске киселине. Како при везивању масних киселина за ХСА и БСА управо карбоксилна глава интерагује са местима везивања, близина доксил групе може да представља сметњу при инкорпорирању 5-ДС у албумин.



Слика 24. а) ЕПР спектар добијен сабирањем спектра 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА у којима је моларни однос [ДС]:[ХСА] = 2:1. б) ЕПР спектар смеше 5-ДС и 16-ДС везане за ХСА. У овом узорку је моларни однос [5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА] = 2:2:1. Концентрација ХСА је у свим узорцима била 0,1 mM (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4)

Табела 3. Вредности $2A_{\max}$ измерене са ЕПР спектра 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА појединачно или у смеши при различитим [ДС]:[ХСА] односима.

[5-ДС]:[ХСА]	$2A_{\max}$ [G]
1:1	$64,1 \pm 0,2$
2:1	$63,6 \pm 0,2$
4:1	$63,7 \pm 0,2$
[16-ДС]:[ХСА]	$2A_{\max}$ [G]
1:1	$59,5 \pm 0,2$
2:1	$59,4 \pm 0,2$
4:1	$59,2 \pm 0,2$
[5-ДС]:[16-ДС]:[ХСА]	$2A_{\max}$ [G]
1:1:1	$61,0 \pm 0,2$
1:2:1	$61,7 \pm 0,2$
2:1:1	$62,2 \pm 0,2$
2:2:1	$60,6 \pm 0,2$

*Концентрација ХСА је износила 0,1 mM (у 100 mM PBS-у, pH 7,4). (Подаци из табеле представљају властите резултате прилагођене из рада аутора дисертације [129].)

У ранијим истраживањима су урађени експерименти конкуренције између 5-ДС, 10-ДС (10-доксил-стеаринска киселина) и 12-ДС, тако да је моларни однос [ДС]:[ХСА] износио 2:1, а различити доксил-стеарати су били присутни у еквимоларним односима [29]. На основу одређених количина неvezаног обележивача за различите парове доксил-стеарата, утврђено је да се ови молекули за ХСА везују у тзв. антипаралелном распореду. То би значило да се молекули било која два доксил-стеарата (без обзира на то да ли су исте врсте, или различите) везују паралелно један другом, тако да се карбоксилне групе налазе на

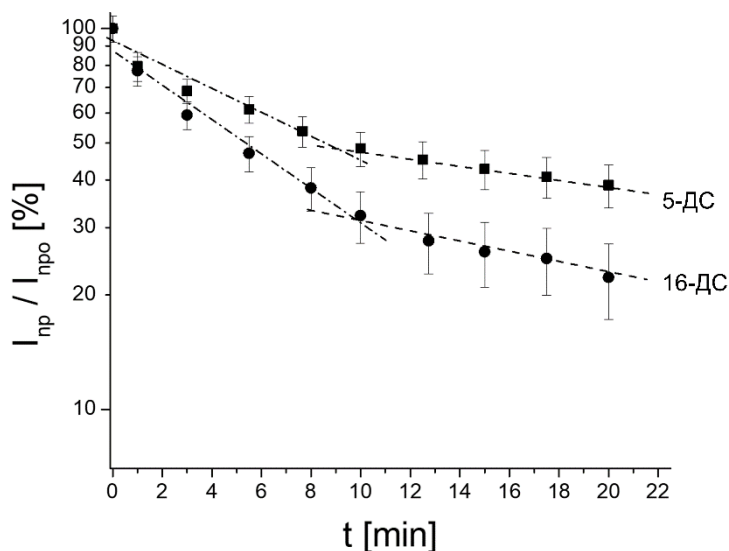
међусобно супротним крајевима. Када се за ХСА вежу два иста или различита молекула ДС, тако да се према моделу антипаралелног распореда, њихове доксил групе налазе на малом растојању (нпр. парови 10-ДС/10-ДС, 12-ДС/12-ДС, 10-ДС/12-ДС, 5-ДС/12-ДС), услед међусобне близине доксил група, настајале би стерне сметње. Последица стерних сметњи је појављивање значајне количине невезаног обележивача у ЕПР спектрима [29]. И у случају испитиваном у оквиру ове дисертације, доксил групе из 5-ДС и 16-ДС су према моделу антипаралелног везивања [29] смештене релативно близу једна другој, што за последицу такође може да има стерне сметње и смањено везивање ових обележивача. На овом месту треба нагласити да се у случају 5-ДС/16-ДС/ХСА комплекса невезани обележивач не манифестује само кроз спектар који се састоји од три оштра пика, тј. преко $I_{\text{вр}}$, већ и кроз мицелу¹⁶ која се лакше наслућује у спектру смеше, него у спектрима појединачних доксил-стеарата. Наиме, “пик” карактеристичан за 16-ДС/ХСА комплекс истакнут на слици 23а се смањује и “заравњује” у спектру смеше, посматрано у односу на чист 16-ДС/ХСА за моларни однос [ДС]:[ХСА] = 2:1 (ради подсећања погледати слику 11).

4.1.4. Кинетика редукције 5-ДС и 16-ДС аскорбинском киселином

Како би се испитало каква је поларност околине доксил групе 5-ДС и 16-ДС у ХСА и колико је ова група близу површини, праћена је кинетика редукције доксил групе аскорбинском киселином. При редукцији доксил групе аскорбинском киселином, од аминоксилног облика ($>\text{N-O}^\bullet$), настаје хидроксиламински облик ($>\text{N-OH}$), који није парамагнетик, тако да се не може детектовати у ЕПР спектру [132]. У случају доксил група које се налазе у хидрофобној средини, редукција аскорбинском киселином ће се одвијати спорије него у воденом раствору, с обзиром на то да је аскорбинска киселина хидрофилан молекула који отежано продире у хидрофобну средину (нпр. мембране, липозоми) [133]. Кинетика редукције 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА су приказане на слици

¹⁶ С обзиром на то да критична мицеларна концентрација одређена за 5-ДС у фосфатном пуферу на рН 7,4 износи $3,5 \cdot 10^{-5}$ М [19], док за 16-ДС овај податак није познат, при великим концентрацијама ДС, значајан део обележивача који није везан за албумин ће се налазити у облику мицеле.

25, на којој је показана зависност односа интензитета пика на ниском пољу у времену t и пре додавања аскорбинске киселине, $I_{np}/I_{про}$, од времена. За добијање ових кинетичких кривих моларни однос $[ДС]:[ХСА]$ је био 1:1, како би сав обележивач био везан за ХСА. У супротном би аскорбинска киселина додатно редуковала и слободни обележивач који се налази у раствору, што би значајно могло да компликује анализу кинетичких кривих.



Слика 25. Зависност односа интензитета пика на ниском пољу, $I_{np}/I_{про}$, од времена, при редукцији 5-ДС (■) и 16-ДС (●) (везаних за ХСА) аскорбинском киселином. $I_{про}$ представља интензитет пика на ниском пољу пре додатка аскорбинске киселине ($t = 0$). Различитим врстама линија су означене брза (— · —) и спора фаза (— —) редукције. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4), 0,1 mM ДС и 1 mM аскорбинску киселину. (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [129].)

Посматрањем графика зависности односа $I_{np}/I_{про}$ (где $I_{про}$ представља интензитет пика на ниском пољу за време $t = 0$, када је претходно обележени ХСА помешан са аскорбинском киселином), од времена (слика 25), може се приметити да се кинетичка крива редукције везаног 5-ДС или 16-ДС састоји из два линеарна дела. То значи да редукција ова два обележивача аскорбинском киселином није једноставна реакција првог реда, због чега је фитована једначином која одговара би-експоненцијалној функцији:

$$\frac{I_{np}}{I_{про}} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (13)$$

где A_1 и A_2 представљају уделе појединачних експоненцијалних чланова у укупној кинетици, док су k_1 и k_2 константе брзина које се редом односе на прву и другу експоненцијалу. Резултати фитовања кинетичке криве једначином (13) су приказани у табели 4.

Табела 4. Вредности параметара добијених фитовањем података о редукцији ДС (везног за ХСА) аскорбинском киселином (подаци су приказани на слици 25). Фитовање је вршено једначином

$$\frac{I_{np}}{I_{pro}} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}.$$

Параметри фитовања	5-ДС/ХСА	16-ДС/ХСА
A_1 (%)	41 ± 2	58 ± 2
A_2 (%)	59 ± 2	42 ± 2
Константа брзине, k_1 (1/min)	$0,31 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$
Константа брзине, k_2 (1/min)	$0,022 \pm 0,002$	$0,034 \pm 0,002$

* Подаци из табеле представљају властите резултате преузете из рада аутора дисертације [129].

Нелинеарност кинетичке криве редукције ДС/ХСА комплекса на семи-логаритамској скали је забележен и раније у студији других аутора [134], међутим резултати нису квантитативно анализирани. За разлику од албумина, када је доксил-стеарат уграђен у липозоме, кинетика редукције аскорбинском киселином је реакција првог реда, што је последица постојања само једне могуће локације за доксил стеарате у оквиру липидног двослоја [133,135]. На основу свега претходно изложеног, може се закључити да постојање две експоненцијале у кинетичкој кривој потиче од редукције молекула обележивача који се налазе на два различита типа места у ХСА са становишта изложености води. Овакав закључак је у сагласности са резултатима о којима је детаљно дискутовано у поглављу 4.1.2. Бржа кинетика, која се на кинетичким кривама оба обележивача уочава до десетог минута, у већој мери потиче од редукције ДС везаног за места која су изложенија води. Међутим, у овом временском интервалу укупној кинетици у мањој мери доприноси и редукција ДС везаног за места која су мање изложена води.

Анализом слике 25 и података приказаних у табели 4, уочава се да се у току почетног, брзог процеса редукције, 16-ДС редукује знатно брже у односу на 5-ДС, из чега се изводи закључак да је доксил група 16-ДС молекула изложенија води у поређењу са 5-ДС. Овакви резултати указују на то да доксил група 16-ДС пролази кроз површину ХСА [19–21,26,34]. Други део кинетичке криве, који

одговара споријој редукцији обележивача (10-20 min) потиче од ДС везаних за места која су мање изложена води. И за ова места, према вредностима константе брзине k_2 , важи да је доксил група 16-ДС изложена води него 5-ДС.

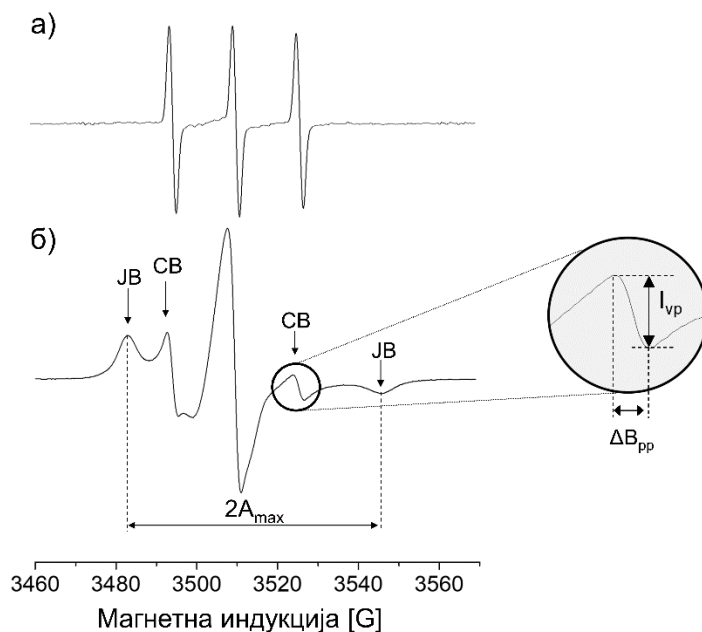
Изложеност води доксил група 5-ДС и 16-ДС везаних за БСА је у литератури испитана помоћу парамагнетика, калијум ферицијанида ($K_3[Fe(CN)_6]$) [27,34]. Наиме, и ова супстанција је као и аскорбинска киселина растворљива у води и отежано продире у хидрофобну средину. Осим тога, пошто је ферицијанид парамагнетик, он убрзава релаксацију других парамагнетика (у овом случају ДС), тј. доводи до ширења и последично опадања амплитуде пикова у ЕПР спектру. На основу скраћења времена релаксације може се проценити фреквенција сусрета између ферицијанида и обележивача, а тиме посредно и изложеност доксил групе води. Тако је за 5-ДС и 16-ДС везане за БСА утврђено да је фреквенција сусрета ферицијанида са доксил групом 16-ДС двоструко већа него са 5-ДС [34], указујући на значајну изложеност доксил групе 16-ДС води. Сличан резултат је добијен и када је праћено смањење амплитуде ЕПР спектра¹⁷ 5-ДС и 16-ДС везаних за БСА у присуству ферицијанида [27]. Резултати изложени у овој дисертацији показују добро слагање са преходно наведним литературним подацима.

4.2. Везивање 3-малеимидо проксила за говеђи серумски албумин

Једини слободан цистеински остатак у говеђем (и хуманом) серумском албумину (БСА), Cys-34, за који се везује 3-малеимидо проксил (5-МСЛ) се налази у релативно плитком хидрофобном цепу, чија је дубина 9,5 Å [74,121,136]. Пошто је ова средина релативно ригидна, ЕПР спектар 5-МСЛ везаног за БСА је услед анизотропије асиметрично проширен у односу на спектар 5-МСЛ у раствору. Са слике 26 се види да се ЕПР спектар 5-МСЛ везаног за БСА састоји из две компоненте, које су као и у случају доксил-стеарата означене као јако везана (ЈВ) и слабо везана (СВ). Анизотропан проширен спектар окарактерисан ширином

¹⁷ Аутори овог рада [27] нису нагласили који пик су користили за мерење амплитуде.

$2A_{\max}$ представља ЈВ компоненту, док СВ компонента има изглед скоро изотропног узаног спектра аминоксила.



Слика 26. а) Типичан ЕПР спектар слободно ротирајућег 5 μ М 3-малеимидо проскила (5-МСЛ) у 50 mM фосфатном пуферу, pH 7,4. **б)** ЕПР спектар 5-МСЛ везаног за БСА (0,15 mM, 50 mM фосфатни пуфер, pH 7,4). Стрелицама су означени пикови који потичу од јако (JB) и слабо везане (CB) компоненте. $2A_{\max}$ је означен испрекиданим линијама и представља ширину спектра. Посебно су означени висина (I_{vp}) и ширина (ΔB_{pp}) пика на високом пољу. Ови параметри су мерени од максимума до минимума пика. Спектар (а) је два пута увећан у односу на спектар (б). (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [123].)

У литератури постоји неколико различитих интерпретација порекла СВ компоненте. Према једном тумачењу, ова компонента потиче од слободног 5-МСЛ у раствору, с обзиром на то да се њен интензитет смањивао при дијализи [61]. Ширење пикова СВ компоненте у односу на спектар воденог раствора 5-МСЛ је приписано већој вискозности раствора БСА спрам воденог раствора [61]. Касније, у другим студијама ови резултати нису били успешно репродуковани, тако да је предложено да СВ компонента потиче од 5-МСЛ обележивача везаног за аминок групе лизина који се налазе на површини албумина [57]. Са слике 26 може се јасно уочити ширење СВ-пикова у односу на пикове 5-МСЛ раствореног у пуферу. Ширина од врха до дна пика на високом пољу, ΔB_{pp} , за 5-МСЛ везан за БСА износи 2,75 G, док је у случају 5-МСЛ раствореног у пуферу вредност овог

параметра 1,77 G. Да би се утврдило да ли је вискозност кључни узрок за ширење пикова СВ компоненте, прво је симулацијама процењен удео ове компоненте у укупном спектру. Резултати симулације су показали да је удео СВ компоненте у укупном спектру, N_{SV} , 4,5-4,7 %¹⁸. Концентрација 5-МСЛ која одговара СВ компоненти је израчуната множењем дуплог интеграла целог спектра уделом N_{SV} и поређењем тако израчунате вредности са дуплим интегралом спектра воденог раствора 5-МСЛ познате концентрације. Овако израчуната концентрација слабо везаног 5-МСЛ је износила 5 μ M. Овај податак је био потребан како би се спремио узорак у којем је концентрација БСА (као и у свим другим финалним узорцима) износила 0,15 mM, чиме је постигнута једнака вискозност раствора у свим узорцима, а 5-МСЛ је био присутан у концентрацији 5 μ M, која је одговарала концентрацији слабо везаног 5-МСЛ. Овако припремљен узорак је снимљен одмах по мешању обележивача са БСА, тако да се 5-МСЛ још није везао за БСА. Ширина пика на високом пољу, ΔV_{pp} , за овај узорак је као и у случају самог 5-МСЛ раствореног у пуферу износила 1,77 G. С обзиром на то да су вискозности овог и узорка чији је ЕПР спектар приказан на слици 266 биле једнаке, а вредности ΔV_{pp} су се међусобно значајно разликовале (за око 1 G), потенцијално се може закључити да СВ компонента вероватно не потиче од слободног 5-МСЛ, као и да ширење пикова ове компоненте вероватно није узроковано вискозношћу албумина. Такође, овде треба бити опрезан са закључцима, с обзиром на то да и варирање концентрације обележивача може да утиче на ширину пикова. У узорку 0,15 mM BSA и 5 μ M 5-МСЛ, концентрација 5-МСЛ је много мања него у узорку чији је спектар приказан на слици 266, тако да је различита концентрација обележивача могући узрок разлике у вредностима ΔV_{pp} . Међутим, у току експерименталног рада је утврђено да је вредност ΔV_{pp} била 1,77 G и за узорке БСА обележеног са 5-МСЛ (после 24 h), када обележивач није био у потпуности уклоњен на колони за гел филтрацију. Овакав резултат говори у прилог томе да ни спин-спин размена није узрок проширених пикова СВ

¹⁸ Симулације су урађене у оба софтверска пакета наведена у поглављу 3.5. ради поређења резултата. Удео N_{SV} одређен помоћу SimLabel-a је износио 4,7 %, што је у доброј сагласности са резултатом добијеним помоћу EPRSIM-C, 4,5%.

компоненте. На основу ове анализе, може се закључити да СВ компонента потиче од 5-МСЛ везаног за аминок групе на површини БСА.

За разлику од СВ компоненте, за ЈВ је из литературе познато да представља 5-МСЛ везан за Cys-34 у БСА [57,60,61]. Пошто се ове две компоненте не преклапају, СВ компонента не смета при читавању вредности $2A_{\max}$, које су даље коришћене за процену степена имобилисаности 5-МСЛ у БСА, на основу чега су праћене промене у непосредној близини Cys-34 при утицају различитих фактора на БСА.

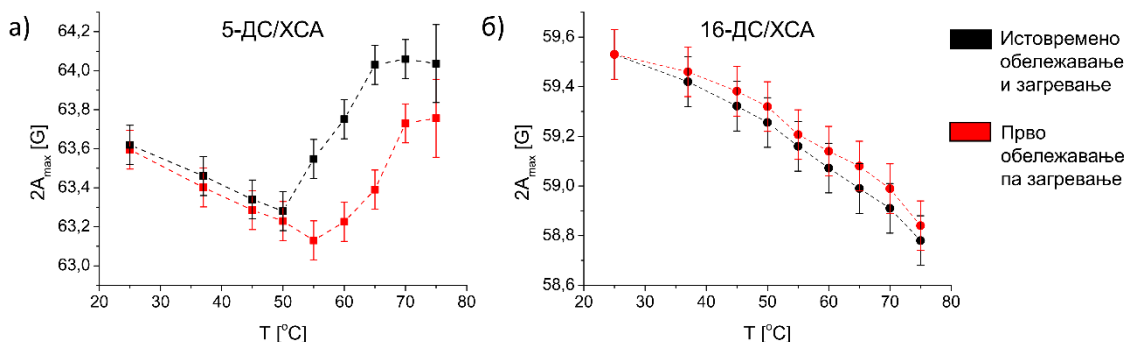
4.3. Испитивање конформационих промена у хуманом и говеђем серумском албумину

4.3.1. Утицај температуре на конформацију ХСА и БСА

4.3.1.1. Утицај температуре на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача

Утицај температуре на конформацију ХСА и БСА је проучаван у опсегу температура 25-75 °C. При томе, за проучавање ХСА помоћу 5-ДС и 16-ДС су коришћена два експерименталана приступа. У једном је раствор ХСА истовремено загреван и инкубиран са 5-ДС или 16-ДС, док је други приступ подразумевао да је ХСА прво максимално везао 5-ДС или 16-ДС на 22 °C, а потом су тако настали комплекси загревани 30 min на одређеној температури. На слици 27 приказане су зависности вредности параметра $2A_{\max}$ од температуре за оба начина припреме узорка. Може се приметити да вредности $2A_{\max}$ показују тренд опадања за оба обележивача до 50 или 55 °C (у зависноти од начина припреме узорка). Овакви резултати се слажу са литературним подацима, у којима је, такође, забележено опадање ширине спектра ДС/ХСА и ДС/БСА комплекса са порастом температуре [24,26,36]. Смањење вредности $2A_{\max}$ у овом температурском опсегу указује на конформационе промене у ХСА, тачније на повећање мобилности обележивача услед разматавања ХСА [137]. Међутим, до

смањења $2A_{\max}$ у извесној мери долази и због убрзавања ротације целог ДС/ХСА комплекса услед повећања температуре [17,117].



Слика 27. Зависност ширине ЕПР спектра $2A_{\max}$ од температуре за 5-ДС/ХСА (а) и 16-ДС/ХСА (б) комплекса. Црна боја означава да су ДС и ХСА истовремено инкубирани и загревани, а црвена да је ХСА прво инкубиран са ДС 30 min, па тек онда загреван 30 min на задатој температури. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1.

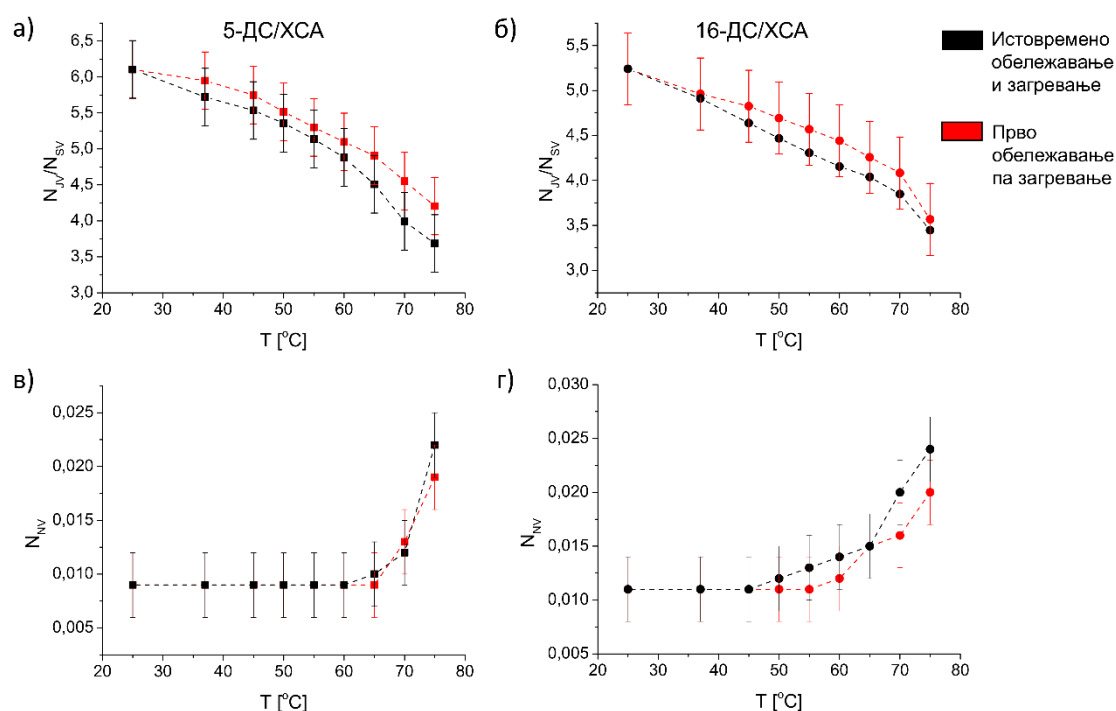
Повећањем температуре изнад 50 °C, односно 55 °C (у зависности од начина припреме узорка) добијају се различити резултати за $2A_{\max}$ 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплексе. Код 5-ДС/ХСА комплекса изнад наведених температура бележи се нагли скок $2A_{\max}$, док за 16-ДС/ХСА $2A_{\max}$ наставља да опада. Овакви трендови указују на то да се у ХСА догађају такве конформационе промене да у просеку доксил групе молекула 5-ДС постају све више имобилисане, како температура расте, док, супротно групе 16-ДС имају све већу слободу кретања. То би значило да хидрофобни џепови у којима је смештена доксил група 5-ДС постају све затворенији, а на површини ХСА околина доксил групе 16-ДС постаје све флексибилнија. У литератури је забележено да до 60 °C, долази до гашења флуоресценције и смањења анизотопије Trp-214 који се такође налази у хидрофобном џепу, што указује на већу изложеност ове аминокиселине води (услед раздвајања домена I и II и постепене денатурација домена II), а да изнад те температуре расте анизотропија и интензитет флуоресценције, што говори о повећаној ригидности околине Trp-214 [138]. Овакве промене које су забележене и у овој дисертацији за околину 5-ДС, могу се објаснити термалном агрегацијом (за температуре изнад 60 °C) молекула ХСА која се догађа тек пошто се делови

албумина размотају тако да хидрофобни џепови постану флексибилнији. На тај начин неки делови протеина постају доступни за успостављање нових међумолекулских веза и то махом хидрофобних интеракција или дисулфидних мостова [139]. Температура (делимично) реверзибилног прелаза ХСА одређена диференцијалном сканирајућом калориметријом (ДСЦ) у зависности од литературног извора износи између 60 и 65 °C [137,140]. Ове температуре су мало више од оне на којој се јавља минимум на слици 27а. То се може објаснити тиме што се помоћу ДСЦ посматрају промене које се догађају на нивоу целог молекула албумина при повећању температуре. Са друге стране, коришћењем спинског обележивача, могу се пратити промене које се одражавају на његову ужу околину. Треба још приметити да се скоковите промене на слици 27а у вредностима $2A_{\max}$ догађају при различитим температурама. За узорке који су припремани истовременом инкубацијом и загревањем раствора 5-ДС и ХСА ова критична температура је нижа (50 °C) него у случају када је ХСА прво обележен са 5-ДС па загреван (критична температура је износила 55 °C). Ова разлика се може објаснити тиме да масне киселине везане за албумин стабилизују његову структуру [141]. Претпоставка је да се масне киселине (у овом случају 5-ДС) које су већ везане за ХСА пре загревања везују на другачији начин у односу на оне које се вежу у току загревања и стога боље стабилизују структуру ХСА. У прилог стабилизацији структуре ХСА претходно везаним 5-ДС обележивачем, говори и чињеница да је у опсегу температура 55-70 °C скок у вредностима $2A_{\max}$ већи при истовременом инкубирању и загревању узорака, него када је ХСА претходно обележен са 5-ДС. За 16-ДС/ХСА комплексе овакво понашање није очигледно, с обзиром на то да се криве приказане на слици 27б преклапају у границама грешке.

4.3.1.1.1. Утицај температуре на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА

Разлагањем спектра на компоненте симулацијом у EPRSIM-C софтверском пакету израчунати су удели невезане (N_{NV}), јако (N_{JV}) и слабо (N_{SV}) везане компоненте. Резултати симулација су приказани на слици 28. Са ове слике се види да оба обележивача, без обзира на начин припреме, показују смањење

удела ЈВ и повећање удела СВ и НВ компонената при повећању температуре. Опадање N_{JV} и раст N_{SV} се слажу са литературним подацима за 16-ДС у опсегу температура 20-50 °C [24,36]. Повећање N_{SV} и N_{NV} на рачун смањења N_{JV} , је последица одмотавања протеина, чиме део ЈВ места постаје флексибилније тако да се трансформишу у СВ места. Такође је могуће и да услед повећања температуре и структурних промена у ХСА део молекула ДС дисосује са ЈВ места и захваљујући отварању појединих хидрофобних цепова почиње лакше да мигрира кроз унутрашњост ХСА, повећавајући удео СВ места [24]. Осим тога, нека од места слабијег афинитета вероватно под утицајем температуре трпе такве промене, да при дисоцијацији ДС, молекули обележивача постају слободни и прелазе у окружујући растварач, одакле могу да се измењују са другим слабије везаним молекулима.



Слика 28. Зависност односа удела јако (ЈВ) и слабо везане компоненте (СВ), N_{JV}/N_{SV} , од температуре за: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекс. На доњој половини слике је приказан утицај температуре на удео невезане компоненте (НВ), N_{NV} , за: **в)** 5-ДС/ХСА и **г)** 16-ДС/ХСА комплекс. Црна боја означава да су ДС и ХСА истовремено инкубирани и загревани, а црвена да је ХСА прво инкубиран са ДС 30 min, па тек онда загреван 30 min на одређеној температури. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1.

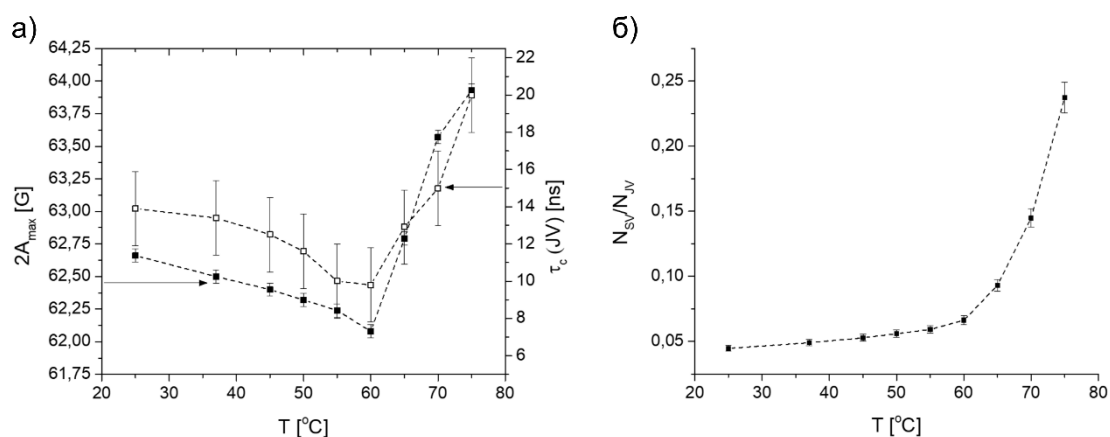
Поређењем кривих зависности свих удела од температуре добијених за два различита начина припреме узорка, уочава се минимална разлика која би требало да говори у прилог томе да 5-ДС и 16-ДС, ако су везани за ХСА пре загревања, као и друге необележене масне киселине, стабилизују структуру албумина. Наиме, за сваки од четири графика приказаних на слици 28 крива која је добијена за узорке који су прво обележени, па загревани, промене у уделима све три посматране компоненте су мање него за узорке у којима је обележивач везиван за ХСА упоредо са загревањем. Овакве разлике се слажу са хипотезом (изнетом у поглављу 4.3.1.1. на месту у којем се дискутује о промени $2A_{\max}$ са температуром) да се обележивачи везују на другачија места (или на другачије начине) у случају када се инкубација одвија истовремено са загревањем у односу на приступ када се инкубација врши на собној температури, па тек онда настали комплекс загрева. Међутим, симулације уносе релативно велике грешке у коначни резултат, тако да се не може са сигурношћу тврдити да разлике између кривих потичу од стабилизације структуре ХСА претходно везаним обележивачима.

4.3.1.2. Утицај температуре на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача

Утицај температуре на околину Cys-34 БСА је, такође, проучаван у наведеном температурском опсегу на узорцима БСА обележеног са 5-МСЛ. Слика 29а приказује зависност $2A_{\max}$ и ротационог корелационог времена ЈВ компоненте, τ_c (ЈВ) (одређеног симулацијом у SimLabel софтверском пакету) од температуре. На 25 °С параметар $2A_{\max}$ је износио 62,65 G, што је мало нижа вредност од оне која је приказана у литератури [59,61]. Ова разлика се може објаснити тиме што је у радовима других аутора, концентрација БСА била неколико пута већа у односу на коришћену у овој дисертацији, тако да је и вискозност узорака БСА била већа, а последично и $2A_{\max}$. Са слике 29а се види да слично као и у случају 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса (поглавље 4.3.1.1), вредности $2A_{\max}$ постепено опадају са порастом температуре у интервалу 25-60 °С, што може да буде у мањој мери последица повећане брзине ротације БСА [59], и термалног одмотавања БСА [137], које доводи до отварања Cys-34 цепа. Овакав

тренд је у сагласности са литературним подацима објављеним за ХСА и БСА обележеним малеимидо-аминоксидима [56,59,61]. Такође, повећање флексибилности Cys-34 цепа са порастом температуре је потврђен и у студијама у којима је праћена промена анизотропије флуоресцентног обележивача везаног за Cys-34 у ХСА [138]. Слично као код 5-ДС/ХСА комплекса, изнад 60 °C $2A_{\max}$ нагло расте, што указује на то да кретање 5-МСЛ обележивача постаје све више ограничено при даљем повећању температуре. Из тога се може закључити да цеп Cys-34 постаје све ригиднији и затворенији, што је подржано сличним трендом који показује τ_c (JV) (слика 29а). Како је раније поменуто у поглављу 4.3.1.1, изнад 60 °C догађа се агрегација молекула БСА [15,142], што може да буде узрок повећане ригидности Cys-34 цепа. При испитивању кинетике агрегације БСА обележеног на Cys-34 малеимидо-флуоресцентном бојом, примећено је да на температурама вишим од 70 °C¹⁹ у првој фази агрегације долази до гашења флуоресценције ове боје услед повећане отворености Cys-34 цепа, док после 10-15 min интензитет флуоресцентне емисије расте, што је објашњено као прогресивно заклањање флуоресцентне боје услед агрегација молекула БСА [15]. Минимум на обе криве приказане на слици 29а који се појављује на 60 °C се поклапа са тачком денатурације БСА, која према литератури варира од 60 до 65 °C у зависности од рН, јонске јачине и концентрације БСА [14,76,143]. Обележавањем ХСА са 5-МСЛ је примећено да је денатурација ХСА на температурама вишим од 60 °C делимично реверзибилна [56], што је потврђено и у овој дисертацији. Може се приметити на основу података у табели 5 да је вредност $2A_{\max}$ за раствор БСА који је прво загрејан до 60 °C, а потом охлађен на 25 °C, већа него за узорак чији је ЕПР спектар снимљен без претходног загревања. Такви резултати имплицирају да Cys-34 цеп постаје ригиднији после (делимично) реверзибилне термалне денатурације што је вероватно последица агрегације.

¹⁹ У овом раду је испитиван утицај само температура виших од 70 °C [15].



Слика 29. а) Зависност ширине ЕПР спектра БСА обележеног са 5-МСЛ, $2A_{\max}$ (приказано пуним квадратићима - ■), и ротационог корелационог времена јако везане (ЈВ) компоненте, τ_c (ЈВ) (приказано празним квадратићима - □) од температуре. **б)** Утицај температуре на однос удела слабо везане (СВ) и ЈВ компоненте, $N_{\text{SV}}/N_{\text{JV}}$. Сви узорци су садржали 0,15 mM БСА (у 50 mM фосфатном пуферу, pH 7,4) обележен са 5-МСЛ. (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [123].)

Табела 5. Вредности ширине ЕПР спектра ($2A_{\max}$) 5-МСЛ/БСА конјугата снимљених на 25 $^{\circ}\text{C}$, током загревања на 60 $^{\circ}\text{C}$ и на 25 $^{\circ}\text{C}$ после хлађења узорка претходно загреваног на 60 $^{\circ}\text{C}$.

	25 $^{\circ}\text{C}$ пре загревања	60 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$ после загревања на 60 $^{\circ}\text{C}$
$2A_{\max}$ [G]	62.65 ± 0.08	62.25 ± 0.08	62.90 ± 0.08

*Овај узорак је садржао 0,15 mM БСА (у 50 mM фосфатном пуферу, pH 7,4) обележен са 5-МСЛ. (Подаци приказани у табели представљају властите резултате преузете из рада аутора дисертације [123].)

Треба још нагласити да се са порастом температуре повећава и амплитуда пикова СВ компоненте (што се у првој апроксимацији може пратити мерењем I_{vp} обележеног на слици 26б, како је описано у поглављу 4.2), што се слаже са истом појавом уоченом код ХСА обележеног са 5-МСЛ [59]. Пошто ширина пика на високом пољу (ΔB_{pp}) на спектрима 5-МСЛ/БСА конјугата опада са температуром (што је такође забележено и у литератури [59]), да би се проучавао раст СВ компоненте, исправније је одредити N_{SV} и N_{JV} , него мерити I_{vp} . На слици 29б показан је утицај температуре на однос $N_{\text{SV}}/N_{\text{JV}}$. Може се приметити да до 60 $^{\circ}\text{C}$ удео СВ компоненте полако расте са температуром, док је изнад 60 $^{\circ}\text{C}$ даљи раст скоковит, што је у складу са појавом минимума кривих са слике 29а на овој

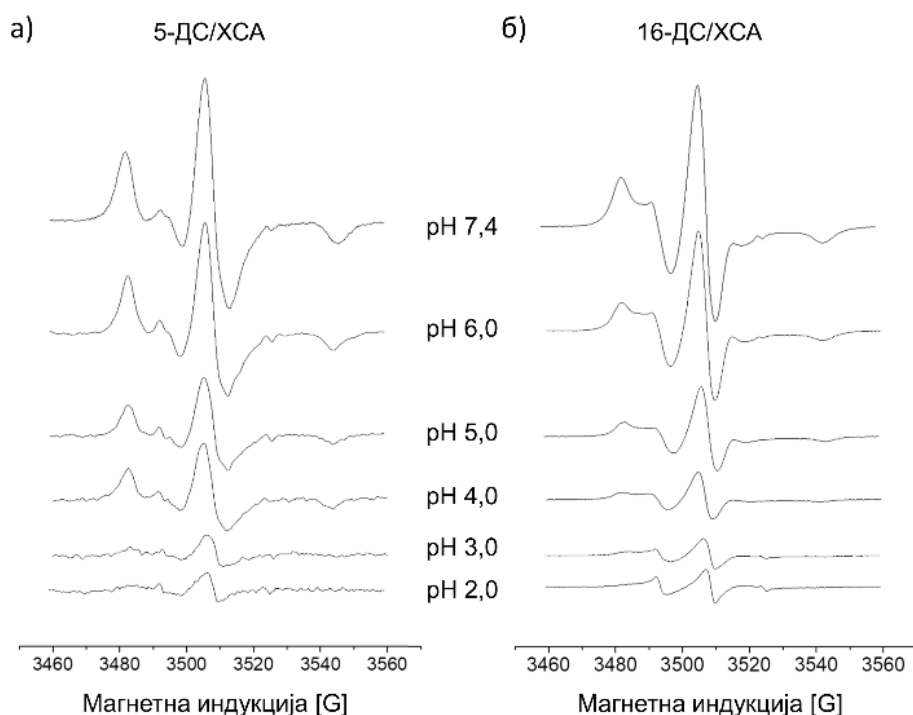
температури. Вредност I_{vp} измерена за узорак који је загрејан на 60 °C је остала непромењена после хлађења овог узорка на 25 °C. После хлађења, овај узорак је пречишћен на Sephadex колони за гел филтрацију, након чега је забележено драстично смањење I_{vp} на вредност која је измерена пре загревања узорка. Стога, може се закључити да количина невезаног 5-МСЛ расте приликом повећања температуре, што је потврђено резултатима других аутора који су установили да се на 26 °C 5-МСЛ/БСА конјугат разграђује [58]. Овакаво понашање је примећено и током израде експеримената у оквиру ове дисертације. Наиме, када су у току припреме узорци БСА обележеног са 5-МСЛ остављани да стоје на собној температури 1 h, повећавале су се амплитуде пикова СВ компоненте. Овај резултат није од важности са становишта испитивања конформационих промена албумина, већ само за руковање узорцима и њихову припрему.

4.3.2. Утицај рН на конформацију ХСА и БСА

4.3.2.1. Утицај рН на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача

За проучавање конформационих промена у ХСА насталих услед варирања рН (које су за ХСА и БСА детаљније описане у поглављу 2.1.1), прво је урађен сет експеримената у којима је ХСА инкубиран 30 min са 5-ДС или 16-ДС (моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1) у 100 mM пуферима чије су се рН вредности кретале у опсегу 2,0-11,0 (цитратни за рН вредности између 2,0 и 6,0; фосфатни пуфер за област рН 6,5-7,5; ТРИС за 8,0-9,5 и карбонатни за 10,0-11,0; сваки од ових пуфера је садржао и 0,9 % NaCl). Примећено је да се интензитет ЕПР спектра ДС/ХСА комплекса нагло смањује за оба обележивача при смањењу рН са физиолошке вредности (7,4), док такво понашање није запажено при повећању базности (слика 30). С обзиром на то да су масне киселине уопштено боље растворљиве у базној, него у киселој средини [144], претпостављено је да је смањење количине везаних молекула 5-ДС и 16-ДС за ХСА узроковано слабијом растворљивошћу ових обележивача у киселој средини. Ова претпоставка је потврђена тиме што је у празну тубицу (из које је узорак извађен ради снимања)

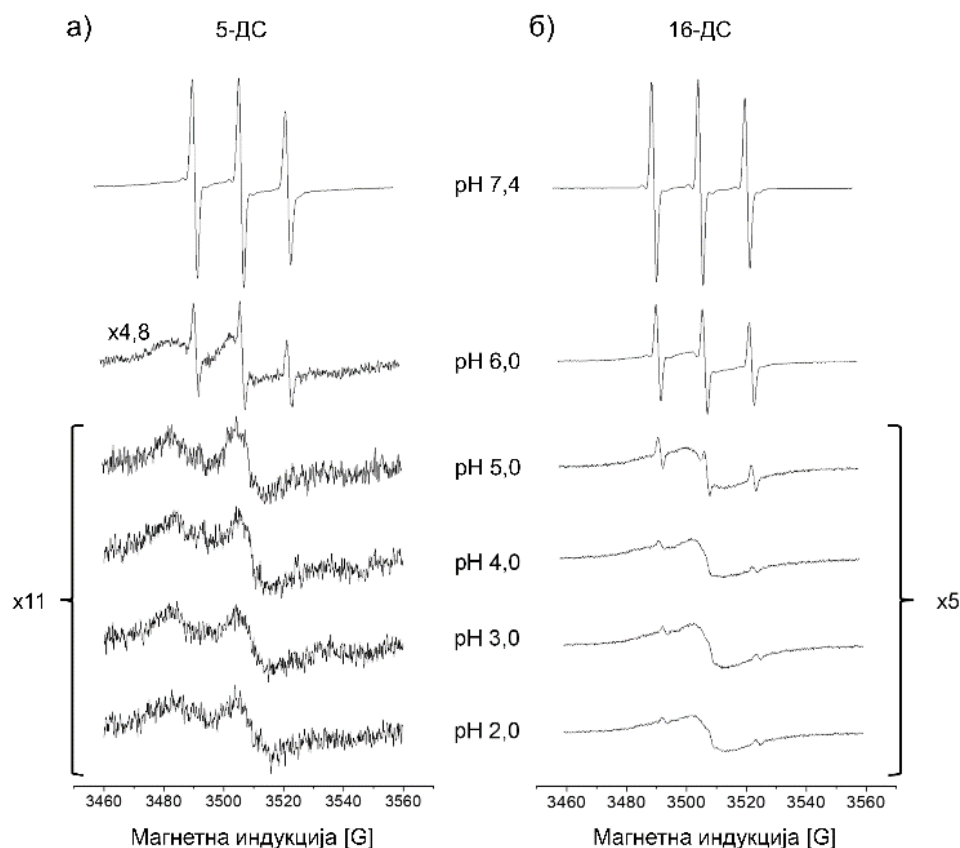
додато 30 μl етанола, а затим је тако припремљен узорак мешан на вортексној мешалици, пипетиран у тефлонско капиларно црево и снимљен на ЕПР спектрометру. Снимањем овог узорка добијен је интензиван триплетни сигнал карактеристичан за алкохолни раствор аминоксилних једињења. То би значило да са повећањем киселости ХСА раствора, мања количина обележивача бива десорбована са дна тубице, због опадања растворљивости ДС. Тиме је у извесној мери смањена доступност обележивача за везивање за ХСА. Са друге стране, са смањењем рН, долази и до одвијања структуре ХСА, што смањује његов капацитет за везивање обележивача.



Слика 30. ЕПР спектри обележивача: **а)** 5-ДС и **б)** 16-ДС инкубираних са ХСА у пуферима различитих рН вредности. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА растворен у 100 mM пуферу (ПБС за рН 7,4, и цитратни који је садржао 0,9 % NaCl за све остале рН вредности). Моларни однос [ДС]:[ХСА] који је требало да буде постигнут био је 2:1. Спектри су приказани на истој интензитетској скали.

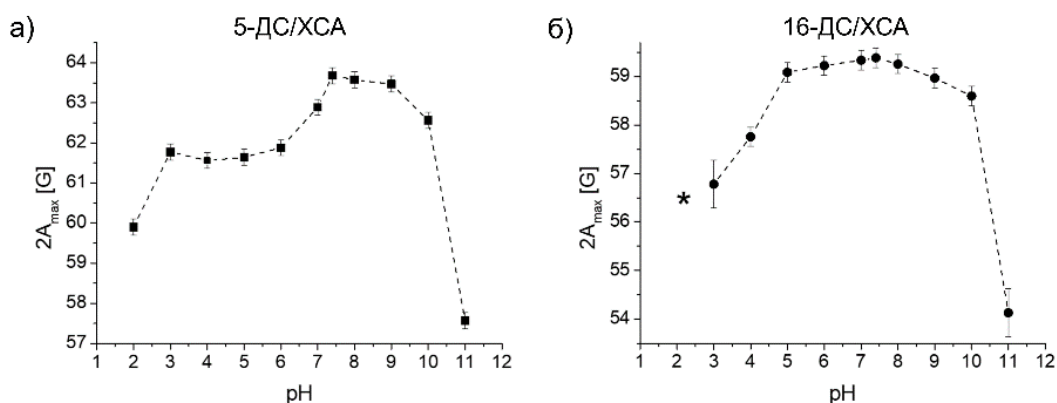
Да би се испитало како се мења растворљивост 5-ДС и 16-ДС са варирањем рН, припремљени су и снимани узорци у којима су 5-ДС и 16-ДС растворени у пуферима различитих рН вредности. Међутим, важно је нагласити да су узорци припремани у пластичним цевчицама са затопљеним дном и целе цевчице су

смештане у ЕПР спектрометар. На тај начин је постигнуто да може да се добије сигнал обележивача који се налази у раствору, али и оног који је остао адсорбован у виду танког филма на дну цевчице. Спектри овако припремљених узорак су приказани на слици 31 и на основу њих, може се приметити да растворљивост оба обележивача нагло опада већ на рН 6,0, пошто се смањује интензитет триплетног спектра. Смањење растворљивости са повећањем киселости је много израженије за 5-ДС него за 16-ДС. Занимљиво је да при смањењу рН, 5-ДС и 16-ДС показују различита понашања, у том смислу што је за 16-ДС јасно да формира мицелу, док 5-ДС са друге стране показује сигнал доста слабијег интензитета у односу на 16-ДС, који по облику подсећа више на јако (имобилисани) везани обележивач. Овако слаб сигнал је вероватно последица велике концентрације 5-ДС адсорбованог на дну цевчице у виду танког филма, што доводи до интензивне спин-спин релаксације.



Слика 31. ЕПР спектри: **а)** 5-ДС и **б)** 16-ДС растворених у 100 mM пуферима (ПБС за рН 7,4, и цитратни који је садржао 0,9 % NaCl за све остале рН вредности). Концентрација оба обележивача је у свим узорцима била 0,2 mM. На слици су приказана и увећања појединачних спектра у односу на спектар добијен на рН 7,4 за одговарајући обележивач.

Како би се лакше разлучиле конформационе промене у ХСА индуковане варирањем рН од ефеката смањене растворљивости обележивача, урађен је још један сет експеримената у којима је ХСА прво инкубиран у 0,9 % NaCl са 5-ДС или 16-ДС тако да је [ДС]:[ХСА] моларни однос такође био 2:1, а потом су раствори формираног ДС/ХСА комплекса мешани са различитим пуферима. Након мешања су провераване рН вредности свих узорака. На слици 32 приказане су вредности $2A_{\max}$ измерене са ЕПР спектра овако припремљених узорака. На први поглед се уочава да је $2A_{\max}$ и за 5-ДС и за 16-ДС највећи у области рН 7,4-8 у којем је ХСА у Н-форми [3] (која је постојана при опсегу рН вредности од 4,5 до 8 [2,3,76]), што значи да је у овом опсегу околина доксил група ових обележивача најригиднија. Варирањем рН ка нижим или вишим вредностима $2A_{\max}$ се смањује што указује на то да околина доксил група оба обележивача постаје флексибилнија, што је у сагласности са претходно написаним у оквиру поглавља 2.1.1. да и у киселој и у базној средини долази до разматавања структуре албумина [2,76,77]. За оба обележивача, како је и очекивано, може се уочити да је трансформација из Н- у Б-форму постепенија од прелаза у киселој средини. Треба још истаћи да на основу криве на слици 30а околина доксил групе 5-ДС (хидрофобни џепови албумина) трпи веће промене у киселој средини у односу на окружење 16-ДС. Овакав тренд је добијен и у раду у којем је измерена ширина спектра на три рН вредности (5,5, 7,5 и 8,5) на 37 °C [24].

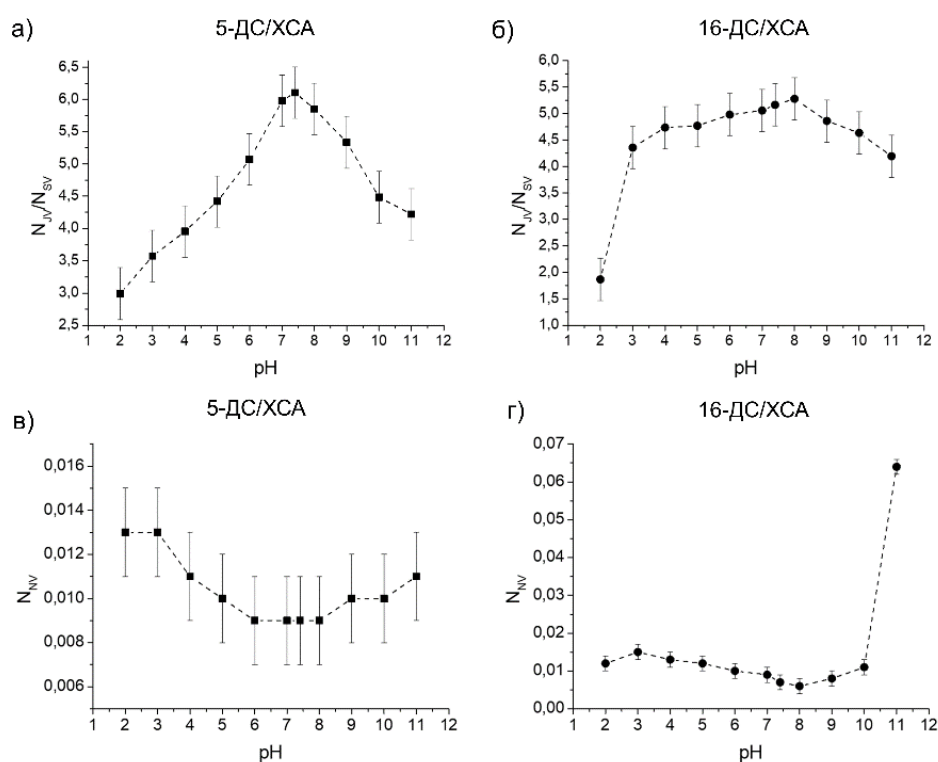


Слика 32. Утицај рН на вредности $2A_{\max}$ измерене са ЕПР спектра: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекса. Сви узорци су припремљени инкубацијом ХСА са 5-ДС или 16-ДС у трајању од 30 min, па је тек онда додаван одговарајући пуфер, тако да је његова концентрација у коначном узорку била 100 mM (цитратни за рН 2,0-6,0; фосфатни за рН 6,5-7,5; ТРИС за 8,0-9,5 и карбонатни за 10,0-11,0; сваки од ових пуфера је садржао и 0,9 % NaCl). Концентрација ХСА је била 0,1 mM, а моларни однос [ДС]:[ХСА] је био је 2:1. Звездицом (*) је означен недостајући податак - услед конформационих промена ХСА са ЕПР спектра је нестало пик потребан за мерење $2A_{\max}$.

4.3.2.1.1. Утицај рН на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА

Одређивањем удела јако (ЈВ), слабо везане (СВ) и невезане (НВ) компоненте у ЕПР спектрима 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса, и приказивањем утицаја рН на ове параметре (слика 33) може се увидети да се мењањем рН од физиолошке (7,4) ка киселој и базној средини смањује N_{JV} , а расту N_{SV} и N_{NV} за оба обележивача. Овакви резултати су у сагласности са израчунатим уделима за 16-ДС/ХСА при три рН вредности (5,5, 7,4, 8,5) [24]. Такође, нагли скок у количини невезаног 16-ДС на рН 11 се слаже са сличним резултатом добијеним за комплекс 12-ДС/БСА [32]. Уопштено, примећује се да је N_{NV} одређен за 16-ДС/ХСА осетљивији на конформационе промене ХСА у целом испитаном опсегу рН вредности у поређењу са 5-ДС/ХСА. При нижим рН вредностима је утврђено да је 5-ДС слабо растворљива (почетак поглавља 4.3.2.1, слика 31), тако да је могуће да део молекула обележивача који је дисосовао са ХСА формира мицелу, па се стога N_{NV} слабије мења са смањењем рН за 5-ДС/ХСА у односу на 16-ДС/ХСА. Смањење удела ЈВ и повећање СВ и НВ компоненте је последица губљења секундарне и терцијарне структуре албумина

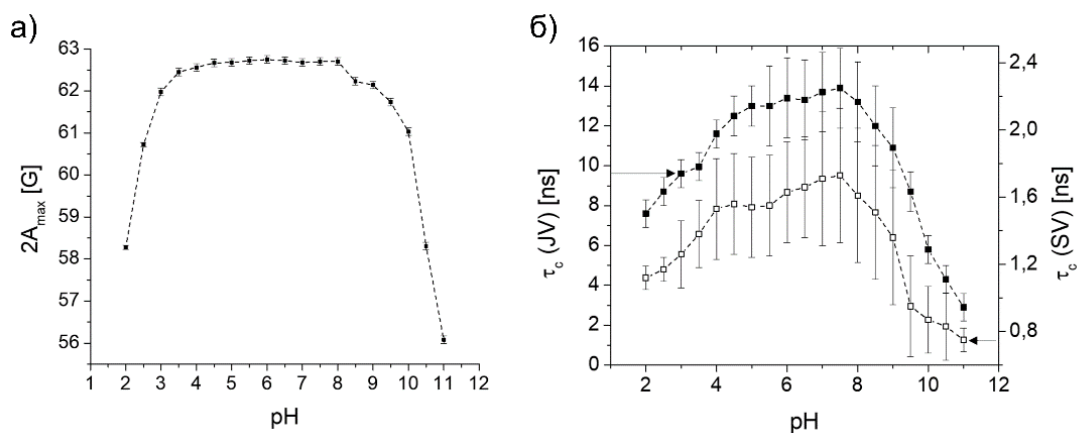
(размотавања албумина). Као и случају конформационих промена индукованих температуром (поглавље 4.3.1.1.1) ове промене у уделима се могу објаснити тиме да, услед повећања флексибилности структуре ХСА, обележивачи могу да дисосују са места јаког везивања и мигрирају кроз унутрашњост ХСА [24], или чак пређу у околни растварач. Може се још приметити да је N_{JV}/N_{SV} однос израчунат за 5-ДС осетљивији на промене рН, у односу на 16-ДС (као и у случају зависности $2A_{max}$ од рН).



Слика 33. Зависност односа удела јако (JB) и слабо везане компоненте (CB), N_{JV}/N_{SV} , од рН за: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекс. На доњој половини слике је приказан утицај рН на удео невезане компоненте (NB), N_{NV} , за: **в)** 5-ДС/ХСА и **г)** 16-ДС/ХСА комплекс. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM пуферима; цитратни за рН 2,0-6,0; фосфатни за рН 6,5-7,5; ТРИС за 8,0-9,5 и карбонатни за 10,0-11,0; сваки од ових пуфера је садржао и 0,9 % NaCl). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1.

4.3.2.2. Утицај рН на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача

Утицај рН на конформацију БСА, и то пре свега на хидрофобни цеп у којем се налази Cys-34, је такође проучаван у опсегу вредности 2,0-11,0 помоћу обележивача 5-МСЛ. На слици 34а приказан је утицај рН на $2A_{\max}$. Може се видети да између рН 4,5 и 8,0 крива достиже плато, што значи да је хидрофобни цеп Cys-34 у овом опсегу веома ригидан. При повећању киселости (рН < 4,5) и базности (рН > 8,0), $2A_{\max}$ се смањује, што указује на то да се при рН-прелазима у киселој и базној средини Cys-34 цеп отвара и постаје флексибилнији. Ротациона корелациона времена израчуната за 5-МСЛ везан за Cys-34 (ЈВ компонента; τ_c (JV)), и за аминок групе (СВ компонента; τ_c (SV)), у границама грешке показују тренд сличан оном приказаном за $2A_{\max}$ (слика 34б). Одатле може да се закључи да се у околинама и Cys-34 и аминок група (лоцираних близу површине) догађају сличне промене у току кисело-базних прелаза што је у сагласности са литературним подацима за опсег рН 2,0-6,0 [54], као и резултатима добијеним коришћењем пет различитих малеимидо-аминоксилних обележивача чије се дужине међусобно разликују [54,55,61]. Такође, сви подаци са слике 34 се слажу са трансформацијама описаним у поглављу 2.1.1, које подразумевају одмотавање албумина и повећање флексибилности његове структуре. Вредности рН при којима се догађају прелази између наведених пет форми није могуће тачно одредити са кривих на слици 34. Други аутори су објавили сличан резултат, уз објашњење да је аминоксилна група 5-МСЛ смештена сувише дубоко у цепу Cys-34 [54,55]. У наведена два рада је сугерисано да је за потребе детекције тачке рН-прелаза потребно користити малеимидо-аминоксилне обележиваче, такве да аминоксилна група може да досегне до отвора Cys-34 цепа. Међутим, ови аутори нису показали резултате за БСА обележан са 5-МСЛ у тако широком опсегу рН. Иако тачке кисело-базних прелаза нису могле да буду одређене коришћењем овог обележивача, то и даље не значи да овај обележивач не може успешно да детектује конформационе промене у БСА.



Слика 34. а) Зависност ширине ЕПР спектра БСА обележеног са 5-МСЛ од рН. **б)** Утицај рН на ротациона корелациона времена јако (JV), τ_c (JV), и слабо везане (SV) компоненте, τ_c (SV). Стрелицама је означено која ордината се односи на коју криву. Сви узорци су садржали 0,15 mM БСА (у 50 mM пуферима; цитратни за рН 2,0-6,0; фосфатни за рН 6,5-7,5; ТРИС за 8,0-9,5 и карбонатни за 10,0-11,0). (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [123].)

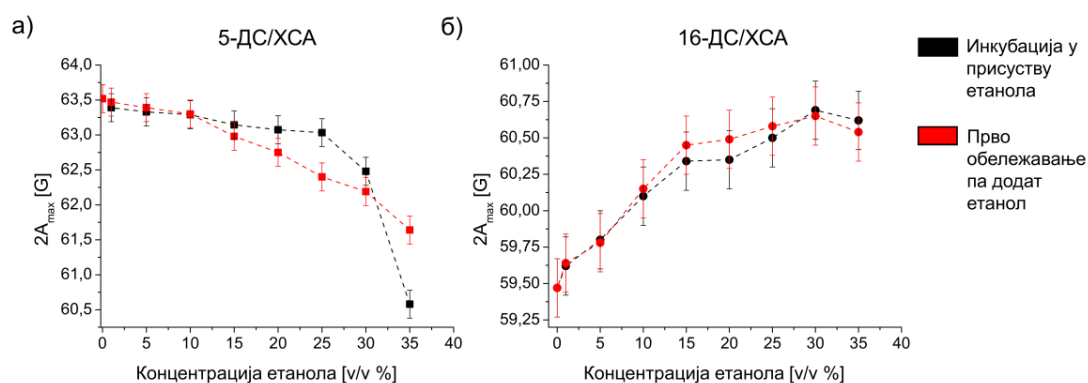
4.3.3. Утицај етанола на конформацију ХСА и БСА

4.3.3.1. Утицај етанола на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача

Етанол се често користи при инкубацији ДС са албумином, због тога што су различити ДС обележивачи слабо растворљиви у води. Тако на пример, када се обележавање узорака серума/плазми са 16-ДС користи као дијагностички тест, при припреми узорака се употребљавају велике количине етанола [44–51]. Због тога је значајно да се испита на који начин етанол утиче на везивање ДС, и уопштено на конформацију албумина, како би се методолошки допринело прецизности дијагностичких тестова базираних на обележавању серума/плазме доксил-стеаратима.

На слици 35 приказан је утицај концентрације етанола на параметар $2A_{\max}$ када су узорци припремани на два различита начина. У једном случају, 5-ДС и 16-ДС су инкубирани 30 min са ХСА у присуству различитих концентрација етанола, док је у другом случају ХСА прво инкубиран са 5-ДС или 16-ДС, па је тако

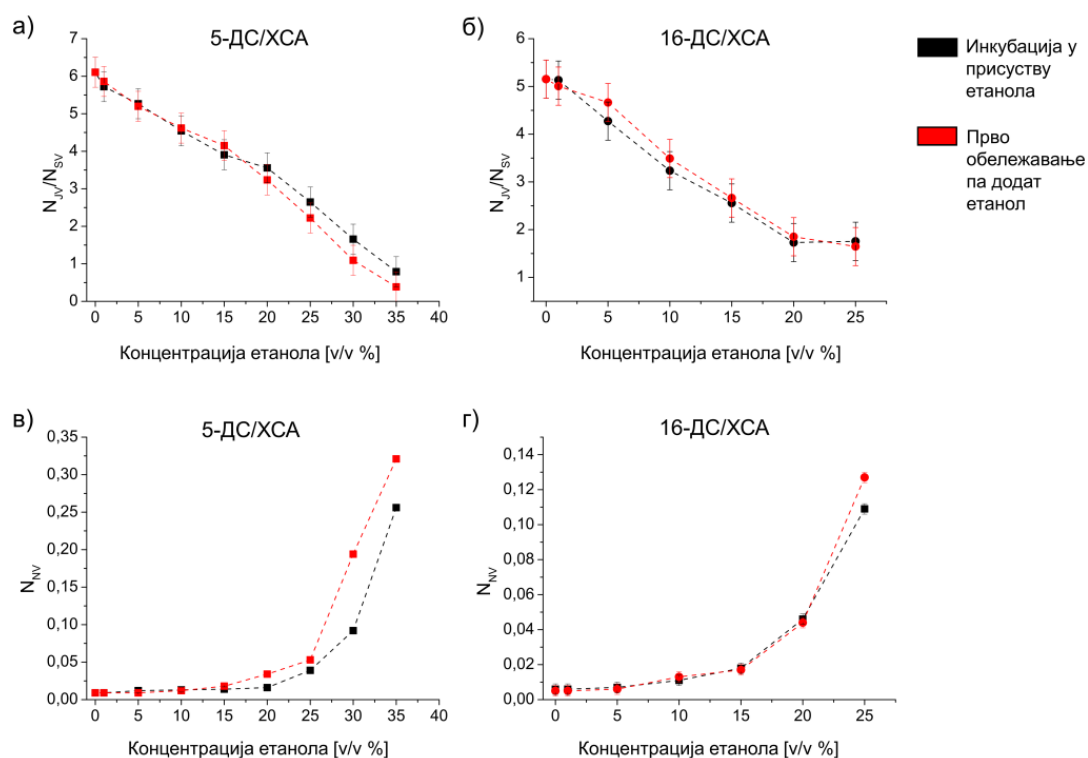
припремљен раствор комплекса мешан са смешама етанол-ПБС (у којима је етанол био присутан у различитим концентрацијама). Са слике 35 се види да без обзира на начин припреме узорка $2A_{\max}$ опада са повећањем концентрације етанола за 5-ДС и расте за 16-ДС. То би значило да околина доксил групе 5-ДС (тј. хидрофобни џепови) постаје флексибилнија, а за 16-ДС ригиднија. Могуће је да у случају 16-ДС, пошто се доксил група овог обележивача налази близу површине, при одмотавању ХСА [10] она постаје више изложена поларној средини, што се у ЕПР спектрима одражава на повећање $2A_{\max}$ [31]. Осим тога, са слике 35а се може видети да редослед операција при припреми узорака 5-ДС/ХСА утиче на зависност $2A_{\max}$ од концентрације етанола. Наиме, при концентрацијама етанола вишим од 10 % бележи се постепен линеарни пад $2A_{\max}$ када се ХСА прво обележи са 5-ДС, па тек онда додаје етанол, док при инкубацији 5-ДС са ХСА у присуству етанола тај пад је у почетку скоро занемраљив, а при 25 % етанола постаје скоковит. Могуће је да се места везивања 5-ДС разликују за ова два начина припреме узорака, па стога долази до различитих трендова промене $2A_{\max}$.



Слика 35. Зависност ширине ЕПР спектра $2A_{\max}$ од концентрације етанола за 5-ДС/ХСА (**а**) и 16-ДС/ХСА комплекс (**б**). Црна боја означава да су ДС и ХСА инкубирани у присуству етанола, а црвена да је ХСА прво инкубиран са ДС 30 min, па је тек онда додаван етанол. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4 са различитим количинама етанола). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1.

4.3.3.1.1. Утицај етанола на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА

Пошто су у радовима у којима се везивање 16-ДС за ХСА користи као дијагностички тест одређују удели јако ЈВ, СВ и НВ као улазни параметри за статистичку анализу, у овој дисертацији је испитано како различите концентрације етанола утичу на вредности удела ових компонената. Са слике 36 уочава се да се N_{JV} смањује, а расту N_{SV} и N_{NV} за оба обележивача, без обзира на начин припреме узорка. Овакав резултат се слаже са литературним подацима добијеним за 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА [21], а такође је у складу и са тим да је утврђено да се етанол везује за албумин на најмање три места везивања масних киселина, те тако постоји конкуренција између етанола и масних киселина [145]. Конформационе промене настале услед присуства етанола се огледају у губљењу секундарне и терцијарне структуре услед формирања водоничних веза између албумина и етанола [10], а такође и интеракција метил групе етанола са хидрофобним џеповима албумина [145]. При томе долази до реорганизације места везивања која се огледа у драстичном смањењу броја места јаког везивања (при концентрацији етанола од 40 % за 5-ДС и 30 % за 16-ДС, није могуће поуздано урадити симулацију, јер је скоро сав обележивач невезан) и дисосовању ДС/ХСА комплекса.

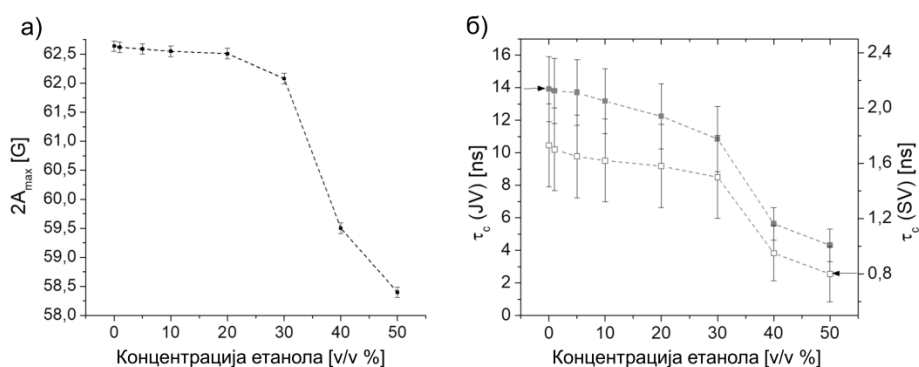


Слика 36. Зависност односа удела јако (JB) и слабо везане компоненте (CB), N_{JV}/N_{SV} , од концентрације етанола за: **а)** 5-DC/XCA и **б)** 16-DC/XCA комплекс. На доњој половини слике је приказан утицај концентрације етанола на удео невезане компоненте (NB), N_{NV} , за: **в)** 5-DC/XCA и **г)** 16-DC/XCA комплекс. Црна боја означава да су DC и XCA инкубирани у присуству етанола, а црвена да је XCA прво инкубиран са DC 30 min, па је тек онда додаван етанол. Сви узорци су садржали 0,1 mM XCA (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4 са различитим количинама етанола). Моларни однос [DC]:[XCA] је био 2:1.

4.3.3.2. Утицај етанола на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача

Како би се испитало како етанол утиче на околину Cys-34, БСА обележен са 5-МСЛ је мешан са смешама пуфер-етанол (у којима је етанол био присутан у различитим концентрацијама). На слици 37а приказана је зависност $2A_{\max}$ од концентрације етанола. Као и у случају 5-DC/XCA, примећује се да се $2A_{\max}$ прво постепено смањује до концентрације етанола 30 %, после чега је пад скоковит. То значи да се Cys-34 цеп са додавањем етанола отвара и постаје све флексибилнији. Слична зависност је добијена и за ротациона корелациона времена JB и CB

компоненте (слика 37б). На основу ових података може се закључити да не само да Cys-34 цеп постаје отворенији, већ и околина аминокиселинска група (које су вероватно лоциране на површини БСА) које одговарају СВ компоненти постаје такође флексибилнија. Промене у околина Cys-34 очигледно представљају двостепени процес, при чему је преломна тачка на око 30 % етанола. То се слаже са резултатима аутора који су показали да до 30 % етанола настаје, како су то аутори назвали, „интермедијерна конформација албумина“, која је окарактерисана водоничним везама које стабилизују секундарну структуру протеина. При вишим концентрацијама етанола (> 30 %), раскидају се иреверзибилно водоничне везе између домена [10,21], што се слаже са повећаном мобилношћу 5-МСЛ везаних за аминокиселинску групу на површини БСА (Слика 37б). Са друге стране, према кристалографским структурама БСА, сулфхидрилна група из Cys-34 се налази релативно близу хидроксилне групе из Тур-84 (тирозина на позицији 84 у аминокиселинској секвенцији), што се може видети на слици 18б [69,86]. Могуће је да се између ове две групе формира водонична веза како је то већ предложено за случај ХСА [136], која се потенцијално раскида у присуству етанола, што може довести до повећане флексибилности Cys-34 цепа.



Слика 37. а) Зависност ширине ЕПР спектра БСА обележеног са 5-МСЛ, $2A_{\max}$ од концентрације етанола. б) Утицај етанола на ротациона корелациона времена јако (JB), τ_c (JV), и слабо везане (SV) компоненте, τ_c (SV). На графику б стрелицама је означено која ордината се односи на коју криву. Сви узорци су садржали 0,15 mM БСА (у 50 mM фосфатном пуферу који је садржао различите количине етанола). (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [123].)

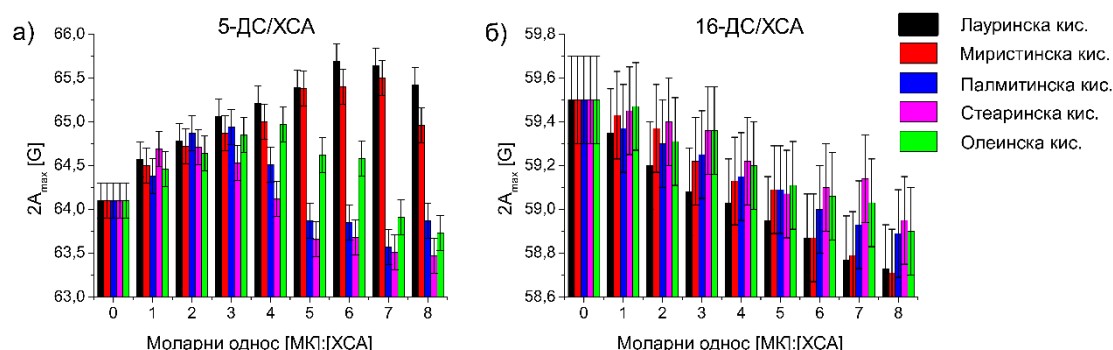
4.3.4. Утицај везивања масних киселина на конформацију ХСА и БСА

4.3.4.1. Утицај везивања масних киселина на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача

Да би се испитало како масне киселине (МК) утичу на конформационе промене албумина, ХСА је инкубиран са пет различитих МК – лауринском, миристинском, палмитинском, стеаринском и цис-олеинском, у различитим моларним [МК]:[ХСА] односима. Овако припремљени узорци су даље обележавани са 5-ДС или 16-ДС, тако да моларни однос [ДС]:[ХСА] буде 1:1. На слици 38 приказан је утицај различитих концентрација наведених пет МК на ширину ЕПР спектра, $2A_{\max}$. Одавде се може видети да претходно везане МК различито утичу на околинду доксил групе 5-ДС и 16-ДС. Наиме, за 5-ДС се уочава да $2A_{\max}$ са повећањем концентрације МК расте, а после одређеног моларног односа [МК]:[ХСА] који се разликује за ових пет МК, бележи се опадање вредности овог параметра. МК средње дужине ланца, лауринска и миристинска киселина, узрокују највећи раст $2A_{\max}$, који је константан све до моларног односа [МК]:[ХСА] = 7:1. Дуголанчане МК, палмитинска, стеаринска и олеинска са друге стране утичу на раст $2A_{\max}$ до односа 2:1-3:1 за палмитинску и стеаринску киселину, и 4:1 за олеинску киселину. Овакви резултати указују на то да се са сваким новим везаним молекулом МК, околина 5-ДС мења у погледу ригидности (и/или поларности) [43], што може да имплицира да се при варирању [МК]:[ХСА] односа мењају и места за која се везује 5-ДС. Сличан закључак може да се изведе и за 16-ДС, међутим код овог обележивача $2A_{\max}$ монотонно опада са повећањем [МК]:[ХСА] односа и то тако да при односима вишим од 6:1 лауринска и миристинска киселина узоркују већи пад $2A_{\max}$ у односу на дуголанчане МК.

Уколико су промене у $2A_{\max}$ изазване у највећој мери променом флексибилности околине, могло би се закључити да лауринска и миристинска киселина, чине околинду доксил групе 5-ДС, и потенцијално целу структуру ХСА најригиднијом у односу на остале масне киселине. Насупрот томе, у присуству дуголанчаних МК, то би значило да се, након пораста ригидности околине 5-ДС

до претходно наведених [МК]:[ХСА] односа, доксил група овог обележивача налази у све флексибилнијој средини. За 16-ДС обележивач би се у том случају опадање $2A_{\max}$ могло тумачити тиме да околина доксил групе овог обележивача постаје све флексибилнија. Међутим, пошто се кроз вредности $2A_{\max}$ огледа и поларност средине, а не само флексибилност/ригидност, овај закључак је само хипотетички. У претходним поглављима у којима је испитиван утицај температуре, рН и етанола (поглавља 4.3.1, 4.3.2. и 4.3.3) промене у $2A_{\max}$ су могле да буду тумачене у контексту промене ригидности околине аминоксилне групе због тога што је познато да ова три фактора утичу на разматавање структуре албумина. Међутим, промене у структури албумина при везивању МК нису тако драстичне. Ако се још узме у обзир да су 5-ДС и 16-ДС у конкуренцији са необележеним МК, није познато за која ће се места везати, поготово ако се има на уму да се МК краћег ланца везују са нижим афинитетом за албумин у односу на дуголанчане [130]. Због тога у овом поглављу, не може са сигурношћу да се тврди да промене у $2A_{\max}$ измерене за 5-ДС и 16-ДС потичу само од ригидности околине доксил група.

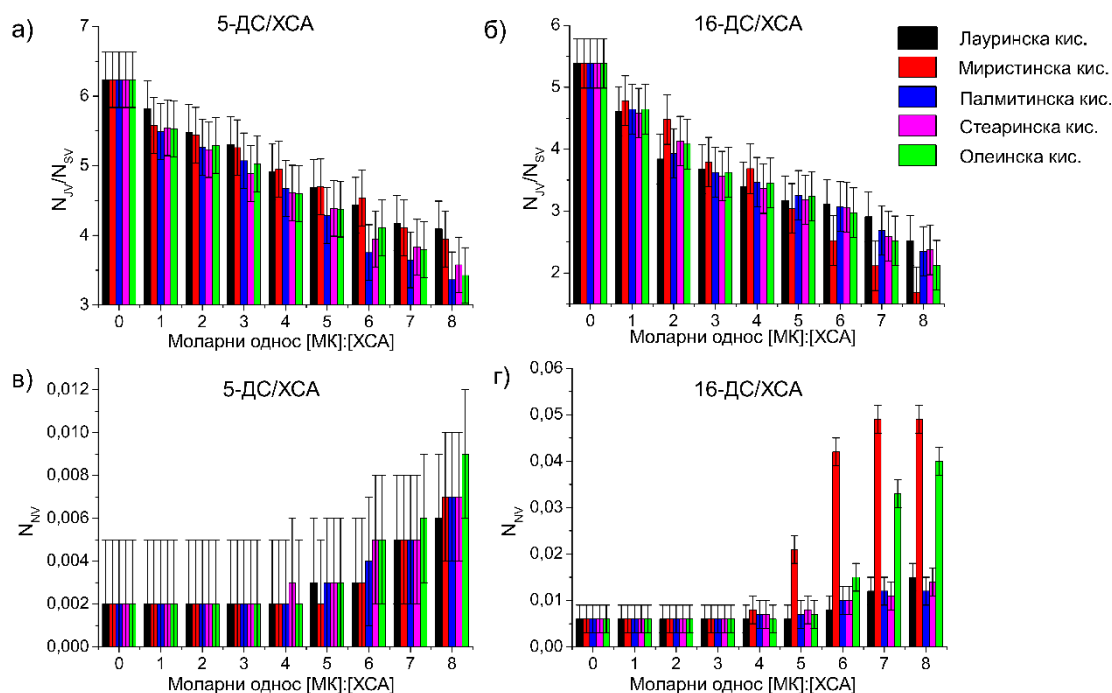


Слика 38. Зависност ширине ЕПР спектра, $2A_{\max}$: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекса од концентрације претходно везаних масних киселина ([МК]:[ХСА]). Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, рН 7,4). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 1:1.

4.3.4.1.1. Утицај везивања масних киселина на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА

Да би се утврдило на који начин се 5-ДС и 16-ДС дистрибуирају на места јаког (JB) и слабог везивања (CB) у присуству различитог броја претходно везаних МК молекула, урађене су симулације чији су резултати приказани на слици 39. Са ових графика може се увидети да при повећању моларних односа [МК]:[ХСА], и за 5-ДС, и за 16-ДС расте удео слабо везаног и невезаног (NB) обележивача, док се количина јако везаног обележивача смањује. Овакав резултат је у складу са резултатима других истраживача у којима је показано да постоји конкуренција између доксил-деривата масних киселина различитих дужина и различитих необележених масних киселина при везивању за ХСА и БСА [25,27,28,30]. Међутим, у овим радовима конкуренција између МК и ДС обележивача није детаљно изучавана, него је послужила само да се испита да ли се доксил-деривати МК везују за иста места као и необележене МК. На основу слике 39 се може приметити да је 16-ДС осетљивији на присуство везаних МК, с обзиром на то да се удели N_{NV} , овог обележивача више мењају него код 5-ДС. Такође, уочава се да N_{NV} за 5-ДС почиње да расте при односу [МК]:[ХСА] 5:1, а за 16-ДС већ при 4:1. Сличан резултат је добијен у раду у којем је БСА био прво обележен са 5-ДС, 12-ДС и 16-ДС, у моларном односу 1:1, па је потом додавана олеинска киселина [30]. Овакво понашање су аутори приписали нижој константи афинитета за везивање 16-ДС за секундарна места у односу на 5-ДС (док је обрнут случај за примарна места) [30]. Осим тога, на слици 39г се примећују велики скокови у N_{NV} при вишим [МК]:[ХСА] моларним односима за миристинску и олеинску киселину у односу на остале МК. За олеинску киселину је овакво понашање очекивано, с обзиром на то да се ова МК за ХСА везује са знатно већим афинитетом од осталих [62,130], док за миристинску киселину није јасно зашто у тој мери сузбија везивање 16-ДС (у поређењу са осталим засићеним МК, пошто количина невезаног 16-ДС није тако велика, свега 5 %), када је познато да константе афинитета за МК расту са повећањем дужине метиленског ланца [62,130]. Могуће је да везивање миристинске киселине за ХСА индукује такве

конформационе промене протеинског молекула да се 16-ДС отежано везује за тако измењену структуру.



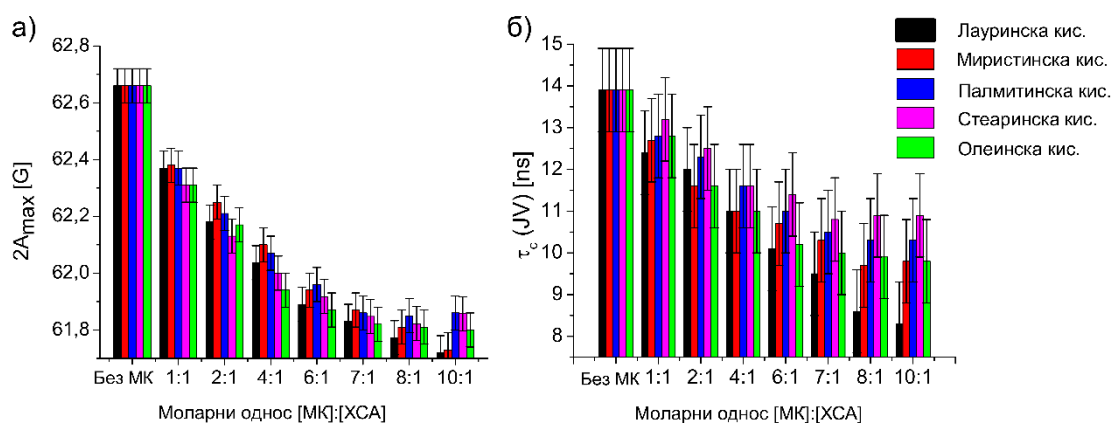
Слика 39. Зависност односа једне (JB) и слабо везане компоненте (CB), N_{JV}/N_{SV} , од концентрације ($[MK]:[XCA]$) пет различитих масних киселина за: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекс. На доњој половини слике је приказан утицај $[MK]:[XCA]$ на удео невезане компоненте (NB), N_{NV} , за: **в)** 5-ДС/ХСА и **г)** 16-ДС/ХСА комплекс. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4). Моларни однос $[ДС]:[ХСА]$ је био 1:1.

Показана зависност удела JB, CB и NB компоненте од количине везане МК може да буде веома корисна са становишта коришћења обележивача 5-ДС и 16-ДС у поменутом дијагностичком тесту. Наиме, повећана количина везаних МК за ХСА, присутна у одређеним патолошким стањима би требало на основу добијених резултата, да утиче на уделе NB, JB и CB компонената, чиме би требало да буде постигнута добра класификација испитаника на пацијенте и здраве контроле.

4.3.4.2. Утицај везивања масних киселина на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача

Како није познато где су у албумину лоциране 5-ДС и 16-ДС у присуству других МК, ради проучавања конформационих промена које настају услед везивања МК, потребно је да се структурне промене детектују са једног познатог места у албумину. Зато је БСА обележен са 5-МСЛ, па је тако формиран конјугат инкубиран са наведених пет МК, у различитим [МК]:[БСА] моларним односима. На овај начин се, такође, проучава директан утицај МК на околину Cys-34, чиме може да се утврди како присуство МК утиче на реактивност ове аминокиселине. С обзиром на то да до сада нису познате кристалографске структуре БСА у комплексу са МК, овде је потребно нагласити да ће се сви резултати добијени за БСА тумачити уз претпоставку да су за ХСА и БСА позиције и број места везивања разних лиганада исте (на основу аналогije у кристалографским структурама између ХСА и БСА, који се не налазе у комплексима [86]). На слици 40а је приказана зависност $2A_{\max}$ од [МК]:[БСА] моларног односа. Са ове слике се може приметити да се $2A_{\max}$ за палмитинску, стеаринску и олеинску киселину смањује до моларног односа 7:1, што указује на повећану флексибилност околине Cys-34 при везивању сваког следећег молекула МК. За ове три МК се у границама грешке запажа сатурација вредности $2A_{\max}$ при моларним односима вишим од 7:1. Овакав резултат се слаже са чињеницом да албумин може да везује седам молекула дуголанчаних МК [2,52,53], тако да при моларним односима [МК]:[БСА] вишим од 7:1 не могу да се уоче значајне промене параметра $2A_{\max}$. Насупрот томе, за лауринску и миристинску МК могу да се уоче додатне мале промене $2A_{\max}$ чак и при односима вишим од 7:1. Овакав резултат се слаже са кристалографским студијама у којима су детектована додатна места везивања за МК средње дужине ланца [52]. На слици 40б је приказана зависност ротационог корелационог времена ЈВ компоненте, τ_c (JV), од [МК]:[БСА] моларног односа. Оваква зависност за τ_c (SV) није приказана, зато што није било корелације између ове величине и [МК]:[БСА] односа. Резултати приказани на слици 40б потврђују претходно изнете закључке. С обзиром на то да су места везивања масних киселина, како је то детаљно објашњено у поглављу 2.1.2.1.2. дистрибуирана на

различитим локацијама у албумину (у унутрашњости сва три домена и између различитих поддомена), на основу података добијених за $2A_{\max}$ и τ_c (JV) може се закључити да везивање сваког следећег молекула МК за БСА доводи до отварања Cys-34 цепа, без обзира на то колико је место везивања МК удаљено од Cys-34. Такав закључак се слаже са литературним податком да реактивност Cys-34 према једињењима која се везују за сулфхидрилне групе расте са повећањем концентрације МК [146]. Такође, према приказаним резултатима (слика 40), везивање првог и другог молекула МК за БСА у највећој мери доводи до отварања Cys-34 цепа, мада ни промене које се догађају при везивању трећег и четвртог молекула МК нису занемарљиве. Како је објашњено у поглављу 2.1.2.1.2, у литератури постоји претпоставка да при везивању МК за домен III (где се налазе места МК3, МК4 и МК5, од којих су МК4 и МК5 места високог афинитета за која би требало да се везују прва два молекула МК) овај домен ротира за мали угао у односу на домен II [99]. Такође, при везивању МК за МК2 (место средњег афинитета), индукује се ротација домена I у односу на домен II [99]. Уопштено гледано, ротације домена III и I у односу на II, доводе до отварања централног цепа који се налази између ова три домена. Имајући све ове информације у виду, може да се претпостави, на основу резултата добијених за Cys-34, да глобално отварање структуре албумина при везивању МК такође узрокује и да цеп Cys-34 постане флексибилнији.



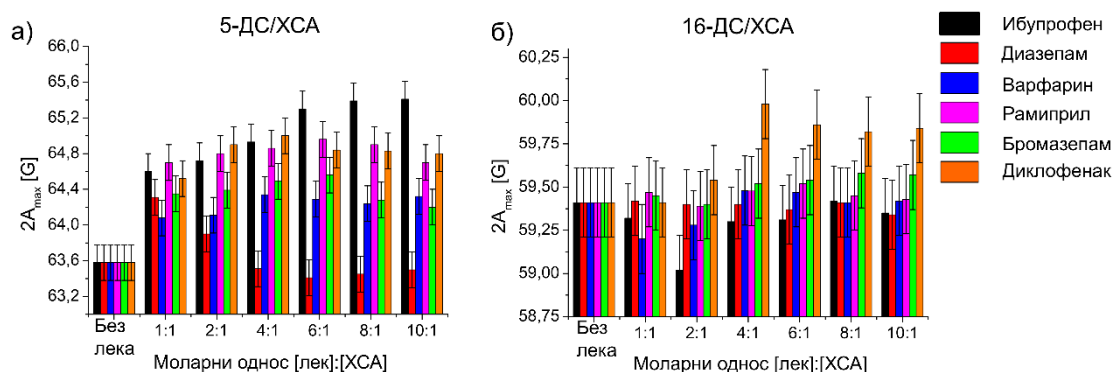
Слика 40. а) Зависност ширине ЕПР спектра БСА обележеног са 5-МСЛ, $2A_{\max}$, од концентрације ([МК]:[БСА]) пет различитих масних киселина. б) Утицај моларног односа [МК]:[БСА] на ротационо корелационо време јако везане (JV) компоненте, τ_c (JV). Сви узорци су садржали 0,15 mM БСА (у 50 mM фосфатном пуферу). (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [123].)

4.3.5. Утицај везивања лекова на конформацију ХСА и БСА

4.3.5.1. Утицај везивања лекова на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача

У овом поглављу је приказано како везивање шест уобичајено коришћених лекова (ибупрофен, диазепам, варфарин, рамиприл, бромазепам и натријум диклофенак) утиче на везивање ДС обележивача за ХСА, с обзиром на то да везивање масних киселина и лекова у неким случајевима може да буде компетитивни процес, а такође и кооперативни услед алостерне модулације [147].

На слици 41 је дата зависност ширине ЕПР спектра $2A_{\max}$ од [лек]:[ХСА] моларног односа, за узорке који су добијени инкубацијом ХСА са различитим концентрацијама наведених лекова, а потом су додавани 5-ДС или 16-ДС, тако да је однос [ДС]:[ХСА] био 2:1. Међу овим лековима, три су типична лиганда за места везивања лекова 1 и 2 (МВЛ1 и МВЛ2; ова места су описана детаљно у поглављу 2.1.2.1.1). Два лека, ибупрофен и диазепам, су типични лиганди за МВЛ2, а варфарин за МВЛ1 [94,97]. На основу слике 41а се уочава да сваки од лекова показује одређен утицај на $2A_{\max}$ за 5-ДС/ХСА и то тако да су вредности овог параметра веће у односу на случај када ХСА нема за себе везане лекове. Изузетак је диазепам, код кога после иницијалног скока при односу [лек]:[ХСА] 1:1, $2A_{\max}$ опада до вредности када за ХСА нису везани лекови. Такође се може приметити да највећи утицај на $2A_{\max}$ има ибупрофен, а за њим следе рамиприл и диклофенак. Анализом података приказаним за 16-ДС (слика 41б) види се да везивање лекова за ХСА показује много слабији утицај на $2A_{\max}$ параметар овог обележивача. Чињеница да се везивање лекова више одражава на промену ширине ЕПР спектра 5-ДС него 16-ДС, указује на то да је доксил група осетљивија на промене настале везивањем лекова ако је смештена у хидрофобној унутрашњости ХСА (5-ДС), него ако се налази близу површине (16-ДС). Такав резултат је и очекиван с обзиром на то да се лекови и везују управо за хидрофобне цепове смештене у унутрашњости ХСА [4,94].



Слика 41. Зависност ширине ЕПР спектра, $2A_{\max}$: а) 5-ДС/ХСА и б) 16-ДС/ХСА комплекса од концентрације лекова ([лек]:[ХСА]). Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1.

За 16-ДС, диазепам, бромазепам и рамиприл готово да не утичу на промену вредности $2A_{\max}$, док најизраженији ефекат показује диклофенак код којег се бележи највећи скок $2A_{\max}$ на односу [лек]:[ХСА] = 4:1. Ибурпрофен и варфарин показују минимуме на односима 2:1 и 1:1 редом, после чега $2A_{\max}$ расте до вредности измерене за 16-ДС/ХСА без лека.

Промене у вредностима $2A_{\max}$ као и у случају везивања масних киселина (поглавље 4.3.4.1), морају да се пажљиво интерпретирају, с обзиром на то да није познато на који ће се начин и за која места везивати молекули 5-ДС и 16-ДС у присуству лекова. Могуће је да повећање вредности $2A_{\max}$ код 5-ДС/ХСА комплекса потиче од повећане ригидности околине доксил групе у присуству лекова. Слично се може тумачити и нагли скок у вредностима $2A_{\max}$ за 16-ДС/ХСА при моларном односу [диклофенак]:[ХСА] 4:1. Насупрот томе, пад у $2A_{\max}$ вредностима за:

- 1) 5-ДС/ХСА/диазепам комплексе (при [диазепам]:[ХСА] односима већим од 1:1),
- 2) 16-ДС/ХСА/ибурпрофен (до [ибурпрофен]:[ХСА] 2:1), и
- 3) 16-ДС/ХСА/варфарин (при [варфарин]:[ХСА] односу 1:1)

би могао да се тумачи као повећање флексибилности околине доксил групе. Међутим, не сме се previdети да све ове промене могу да потичу и од различитих поларности места за која су се везали 5-ДС и 16-ДС [31]. Иако је тешко у овом случају интерпретирати промене параметра $2A_{\max}$, резултати који су добијени

показују добро слагање са литературним подацима о броју места везивања за сваки од ових лекова. Ови подаци су сумирани у табели 6. Наиме, за сваки од лекова може се уочити да постоји одређени моларни однос [лек]:[ХСА] изнад којег се $2A_{\max}$ практично више не мења. Тај „критични“ однос се добро слаже са бројем места везивања која су пронађена у литератури.

Табела 6. Преглед података из литературе о броју и локацији места везивања испитиваних шест лекова на ХСА и БСА.

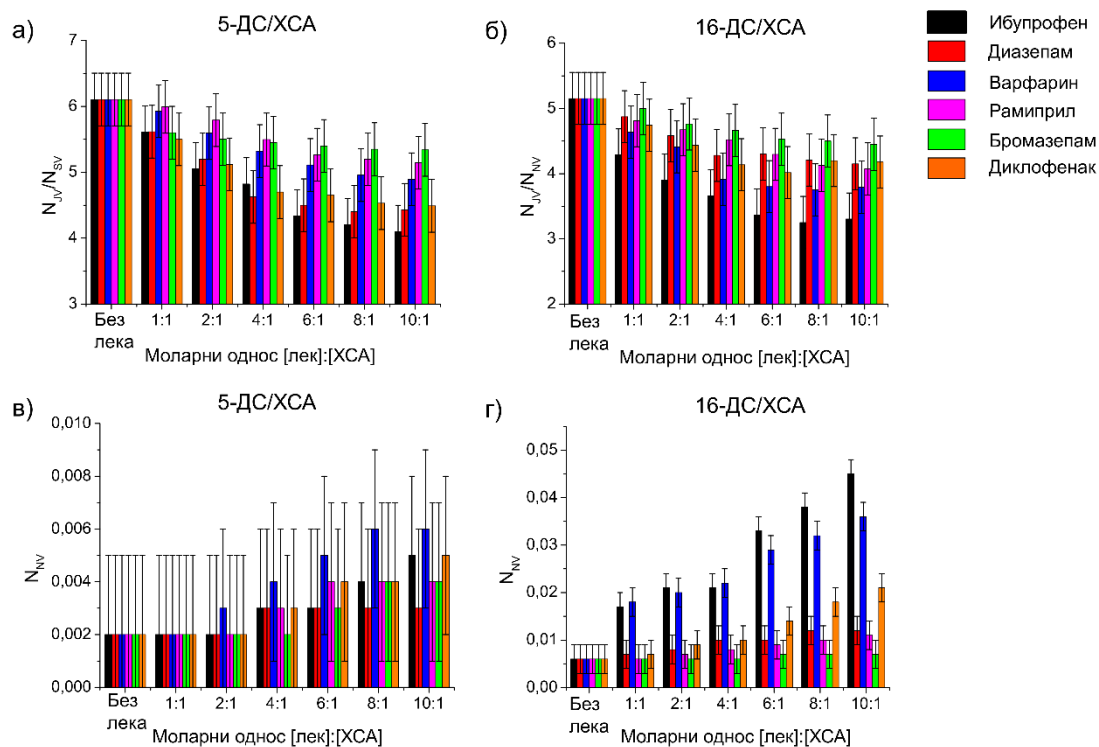
Лек	Број места	Локације идентификованих места
Ибупрофен	6 [148]	МВЛ2 (примарно) [94], МВЛ1 [94], МК2 и МК6 [149]
Диазепам	3 [150]	МВЛ2 (примарно) [94]
Варфарин	4 [151]	МВЛ1 (примарно) [94], поддомен IB [98]
Рамиприл	1 (у БСА) [152]	МВЛ1 [152]
Бромазепам	1 [153]	Није идентификовано
Диклофенак	3 [154]	Поддомен IB, два места у МВЛ1 [154]

4.3.5.1.1. Утицај везивања лекова на уделе невезаног, слабо и јако везаног ДС обележивача за ХСА

Ради бољег разумевања распоређивања 5-ДС и 16-ДС у ХСА у присуству наведених шест лекова, симулацијама су одређени удели јако (N_{JV}), слабо везане (N_{SV}) и невезане компоненте (N_{NV}). Зависност ових удела од моларног односа [лек]:[ХСА] је приказан на слици 42. Са ове слике се може приметити да се у присуству лекова смањује удео JV, а расту удели СВ и НВ компонената, као и у случају претходно везаних масних киселина. Очигледно сви лекови у мањој или већој мери утичу на то да се 5-ДС и 16-ДС другачије расподеле у ХСА у односу на ситуацију када лекови нису претходно везани за ХСА. Посматрајући зависност N_{JV}/N_{SV} од моларног односа [лек]:[ХСА], за оба обележивача може се увидети да као и код параметра $2A_{\max}$ постоји однос [лек]:[ХСА] изнад којег се вредност N_{JV}/N_{SV} не мења.

Посматрањем удела N_{NV} види се да је 16-ДС осетљивији на присуство лекова, док су за 5-ДС промене N_{NV} готово занемарљиве, што се као и у случају везивања масних киселина (поглавље 4.3.4.1.1) може приписати већој константи афинитета за везивање 5-ДС за секундарна места, у односу на 16-ДС [30]. Због

тога ће даље бити дискутована само појава неvezаног 16-ДС. Највеће промене у количини неvezаног 16-ДС се примећују за ибупрофен и варфарин. За ибупрофен се такво понашање и очекује с обзиром на то да се везује за шест места од чега се његово примарно место везивања, МВЛ2 поклапа са местима МК3 и МК4 (место везивања масних киселина високог афинитета), а секундарна са МВЛ1 (које је истовремено и место МК7), МК2 и МК6 [94,148,149]. Код варфарина, примарно место везивања, МВЛ1 се поклапа са МК7, које представља место везивања МК ниског афинитета [2,94], тако да појава неvezаног 16-ДС при везивању првог молекула варафрина за ХСА вероватно потиче од конформационих промена које индукује варфарин. Диазепам, који се као и ибупрофен везује примарно за МВЛ2, доводи до незнатног повећања количине неvezаног 16-ДС за све [дiazепам]:[ХСА] моларне односе. Разлог вероватно лежи у томе што ибупрофен и diaзепам на различите начине интерагују са МВЛ2 [94]. Слично важи и за рамиприл који се везује за МВЛ1 у БСА [152], а полази се од претпоставке да се везује за ово место и у ХСА. Уколико је ова хипотеза тачна, онда би то значило да два лека која се везују за МВЛ1 не утичу исто на везивање 16-ДС, вероватно због различитих интеракција са местима везивања или услед индуковања конформационих промена које би могле да блокирају везивање 16-ДС. Умерен раст неvezаног 16-ДС услед везивања диклофенака вероватно потиче од тога што се и за овај лек сва три идентификована места поклапају са местима везивања масних киселина – МК1 у поддомену IB, а два места везивања у МВЛ1 се преклапају са МК7 [154]. У случају бромазепама се N_{NV} за 16-ДС говото не мења, што може да буде последица тога што за овај лек постоји само једно место везивања на ХСА [153].



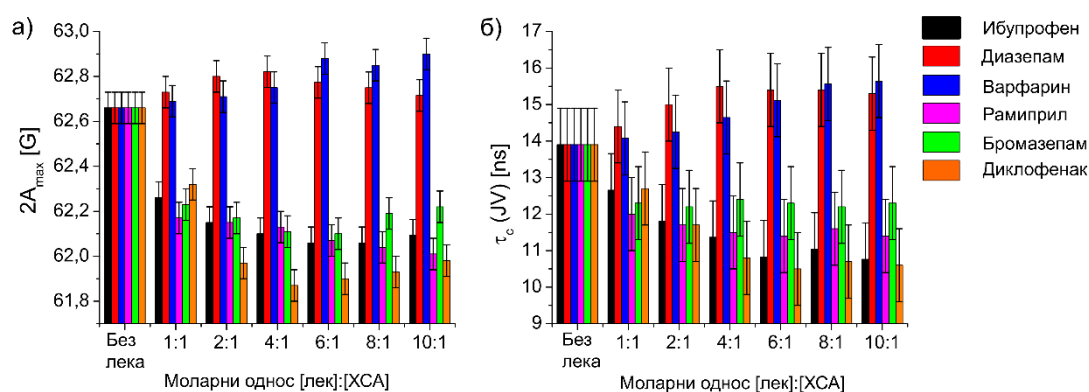
Слика 42. Зависност односа удела јако (JB) и слабо везане компоненте (CB), N_{JV}/N_{SV} , од концентрације ([лек]:[ХСА]) шест различитих лекова за: **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекс. На доњој половини слике је приказан утицај [лек]:[ХСА] на удео невезане компоненте (NB), N_{NV} , за: **в)** 5-ДС/ХСА и **г)** 16-ДС/ХСА комплекс. Сви узорци су садржали 0,1 mM ХСА (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4). Моларни однос [ДС]:[ХСА] је био 2:1.

Резултати у којима се описује утицај лекова на уделе N_{JV} , N_{SV} и N_{NV} у суштини може да представља проблем при коришћењу 16-ДС у сврхе дијагностичког маркера утолико што ови удели онда одражавају промене у капацитету везивања ХСА које не потичу само од метаболита и токсина специфичних за одређена патолошка стања, већ и од присуства лекова који се уобичајено користе у терапији. Са друге стране, показана осетљивост ових удела на присуство лиганата уопштено је погодност која омогућава да се проучавају интеракције разних супстанција са ХСА, што је важно при испитивању фармакокинетики и фармакодинамике.

4.3.5.2. Утицај везивања лекова на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача

Да би се испитао утицај везивања лекова на конформационе промене у албумину, као и у случају масних киселина (поглавље 4.3.4.2), пожељно је да се иноформације о њима добијају са једног места (уместо са више као у случају ДС обележивача). Из тог разлога је 5-МСЛ/БСА конјугат инкубиран са различитим концентрацијама наведених шест лекова²⁰. Промене у околини Cys-34 при везивању ових лекова за БСА су праћене преко параметра $2A_{\max}$ и ротационог корелационог времена јако везане компоненте, τ_c (JV) (слика 43). Ротационо корелационо време слабо везане компоненте, τ_c (SV) у зависности од моларног односа [лек]:[БСА] није приказано због тога што није пронађена корелација између овог параметра и концентрације лекова. У оквиру граница грешке, параметри $2A_{\max}$ и τ_c (JV) за сваки лек појединачно показују сличан тренд (слика 43), дајући конзистентне информације о променама у околини Cys-34. Уопштено, може се приметити да већина ових лекова узрокује смањење $2A_{\max}$ и τ_c (JV), што значи повећање флексибилности Cys-34 цепа. Такође, за већину лекова, највеће промене у вредностима ових параметара се примећује при моларном односу [лек]:[БСА] = 1:1.

²⁰ Услед недостатка литературних података о локацијама везивања испитиваних шест лекова за БСА, овде ће бити претпостављено да је број и локација места везивања за БСА иста као у ХСА.



Слика 43. а) Зависност ширине ЕПР спектра БСА обележеног са 5-МСЛ, $2A_{\max}$, од концентрације ([лек]:[БСА]) шест различитих лекова. **б)** Утицај моларног односа [лек]:[БСА] на ротационо корелационо време јако везане (ЈВ) компонентне, τ_c (ЈВ). Сви узорци су садржали 0,15 mM БСА (у 50 mM фосфатном пуферу). (Слика је властити резултат прилагођен из рада аутора дисертације [123].)

Са слике 43 може се приметити да ибупрофен утиче на смањење $2A_{\max}$ и τ_c (ЈВ) вредности при свим односима [лек]:[БСА] у поређењу са узорком 5-МСЛ/БСА који није имао за себе везане лекове. То значи да ибупрофен утиче на отварање Cys-34 цепа, при чему се највећа промена уочава при односу 1:1, тако да везивање првог молекула овог лека за БСА индукује највећу промену. Као што је већ примећено у случају масних киселина (поглавље 4.3.4.2) криве на слици 43 (а и б) показују сатурацију при односима [ибупрофен]:[БСА] већим од 6:1. Овакав податак се слаже са литературним подацима о броју места везивања ибупрофена за ХСА који су дати у табели 6 (поглавље 4.3.5.1). Сва три идентификована секундарна места се преклапају са местима везивања масних киселина, за које је показано у поглављу 4.3.4.2. да испољавају сличан ефекат на околину Cys-34.

Иако се диазепам везује за исто примарно место као и ибупрофен, МВЛ2, промене у вредностима нису тако изражене као у случају ибупрофена. Чак се за диазепам, на супрот ибупрофену, уочава благи раст вредности $2A_{\max}$ и τ_c (ЈВ), што сугерише да се повећава ригидност Cys-34 цепа. Различити ефекти ибупрофена и диазепам (лекова који се везују за исто примарно место) на околину Cys-34, као и у случају 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА (поглавље 4.3.5.1) може да потиче од њихових различитих структура, услед чега се успостављају различите интеракције између БСА и ових лекова [94]. Лек који је типичан лиганд за МВЛ1, варфарин, као и

дiazепам, узрокује слаб пораст вредности $2A_{\max}$ и τ_c (JV) при свим [лек]:[БСА] моларним односима, што значи да се цеп Cys-34 затвара и постаје ригиднији. У оквирима грешке, резултати изнети у овој дисертацији се слажу са литературним подацима о броју места везивања diaзепамa и варфарина (табела 6, поглавље 4.3.5.1). Сва три остала лека, рамиприл, бромазепам и диклофенак, утичу у различитој мери на смањење $2A_{\max}$ и τ_c (JV), тј. индукују отварање структуре цепа Cys-34 при свим [лек]:[БСА] моларним односима. За бромазепам и рамиприл се уочава да при односима [лек]:[БСА] већим од 1:1 долази до сатурације (тј. $2A_{\max}$ и τ_c (JV) се изнад овог односа више не мењају значајно), док се код диклофенака сатурациони тренд јавља при односима вишим од 4:1. Ови резултати се, као и за лекове који су типични лиганди за МВЛ1 и МВЛ2, слажу са литературним подацима о броју места изнетим у табели 6 (поглавље 4.3.5.1).

Уопштен закључак који се може извести јесте да, иако се лекови везују за исто место, без обзира на то да ли је оно примарно или секундарно, није могуће утврдити правило како ће везивање лека за одређено место утицати на везивање 5-ДС и 16-ДС, или на конформационе промене које се одражавају на околину Cys-34. Тако нпр. ибупрофен и diaзепам који деле исто примарно место везивања, различито утичу на везивање ДС обележивача (а посебно 16-ДС), а када је у питању околина Cys-34 испољавају потпуно супротне ефекте са становишта ригидности/флексибилност Cys-34 цепа. Слична је ситуација и са рамиприлом и варфарином чије примарно место представља МВЛ1. Овакви резултати су последица различитих интеракција лекова са местима везивања на албумину.

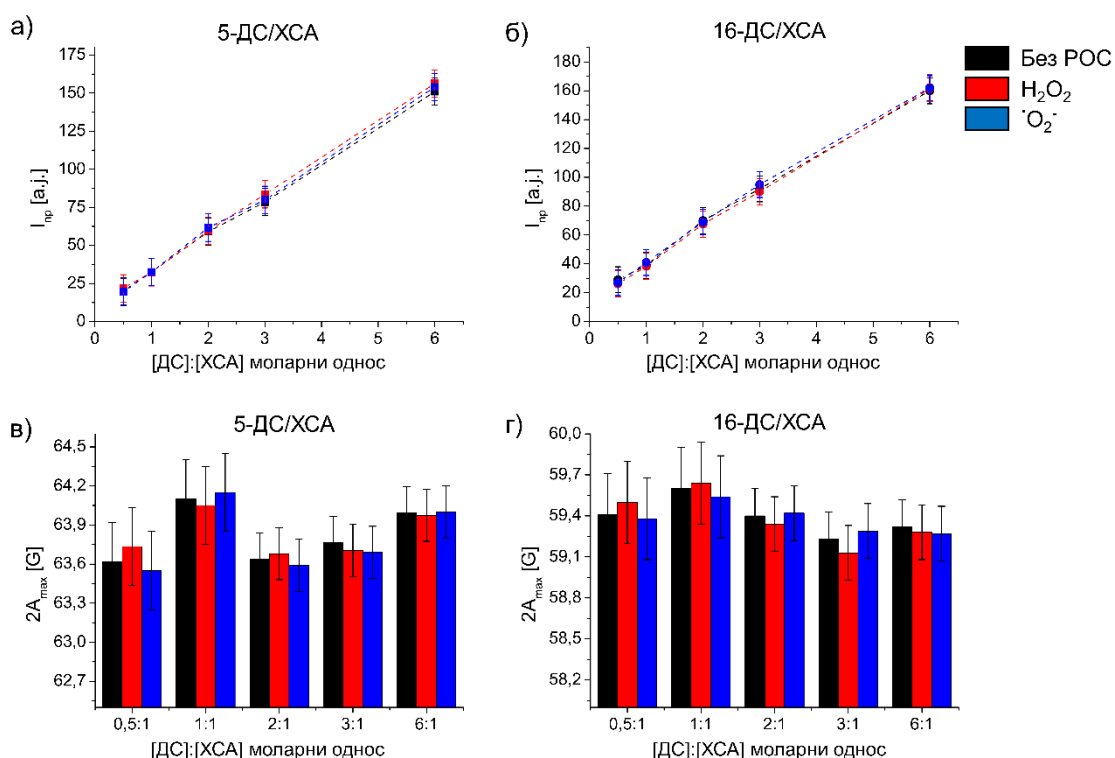
4.3.6. Утицај реактивних кисеоничних врста на конформацију ХСА и БСА

4.3.6.1. Утицај реактивних кисеоничних врста на конформационе промене ХСА испитане помоћу ДС обележивача

Према данашњим сазнањима, оксидативни стрес је детектован у многим патологијама, као што су канцер, метаболички поремећаји, кардиоваскуларне, неуродегенеративне и друге болести [64]. Под термином оксидативног стреса се

подразумева дисбаланс у количини антиоксиданаса са једне стране и реактивних кисеоничних (РОС, од енглеског *Reactive Oxygen Species*) и азотних врста (РНС, од енглеског *Reactive Nitrogen Species*) са друге [155]. Познато је да РОС могу да изазову оштећења протеина, а како је албумин главни антиоксиданс у крви [6], услед различитих патолошких стања, може да претрпи оксидативне модификације. У овом поглављу ће стога бити показано како водоник-пероксид, H_2O_2 и супероксидни анјонски радикал, O_2^- , утичу на капацитет везивања и конформацију албумина.

Да би се испитао утицај РОС на капацитет везивања, ХСА је помешан у еквимоларном односу са H_2O_2 или KO_2 (хемијски генератор супероксидног радикала), а затим је инкубиран са ДС обележивачима. На слици 44 (а и б) су приказане зависности висине пика на ниском пољу (I_{np}) ЕПР спектра 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса (третираних са РОС и нетретираних) од моларног односа [ДС]:[ХСА]. На основу ове слике, види се да ни H_2O_2 , ни O_2^- не утичу на промену I_{np} , чак ни при високим односима [ДС]:[ХСА]. Одавде би се могло закључити да ове две реактивне врсте не мењају капацитет везивања ХСА према молекулима 5-ДС и 16-ДС. Међутим, како је раније поменуто у поглављима 2.2.3. и 4.1, I_{np} може да зависи и од ширине пика на ниском пољу и ширине целог спектра, $2A_{max}$, стога је и ова величина одређена са ЕПР спектра за [ДС]:[ХСА] моларне односе од 0,5:1 до 6:1 (слика 44 в и г). Лако се примећује да се вредности $2A_{max}$ за ХСА третиран са H_2O_2 и O_2^- не разликују у односу на нетретиран ХСА, што указује на то да H_2O_2 и O_2^- при коришћеним концентрацијама не утичу на окружења доксил група оба обележивача. Разлагњем ЕПР спектра на компоненте добија се да су вредности удела N_{NV} , N_{JV} и N_{SV} у границама грешке једнаки за оба обележивача у случају ХСА третираног са РОС и нетретираног, тако да ови резултати нису ни приказани. На основу свега наведеног, намеће се закључак да инкубацијом ХСА са H_2O_2 или KO_2 при датим моларним односима [РОС]:[ХСА] и концентрацијама не долази до промене капацитета везивања ХСА за 5-ДС и 16-ДС (а вероватно ни за друге масне киселине), нити се могу детектовати промене у околини доксил група ова два обележивача.



Слика 44. Утицај H_2O_2 и O_2^- на висину пика на ниском пољу (I_{np}) и на ширину ($2A_{max}$) ЕПР спектра. На горњој половини слике је приказан утицај H_2O_2 и O_2^- на висину пика на ниском пољу (I_{np}): **а)** 5-ДС/ХСА и **б)** 16-ДС/ХСА комплекса при различитим [ДС]:[ХСА] моларним односима. На доњој половини слике је приказан утицај H_2O_2 и O_2^- на ширину ($2A_{max}$) ЕПР спектра: **в)** 5-ДС/ХСА и **г)** 16-ДС/ХСА комплекса при различитим [ДС]:[ХСА] моларним односима. У свим узроцима концентрација ХСА је била 0,1 mM (у 100 mM ПБС-у, pH 7,4), а однос $[H_2O_2]:[ХСА]$, односно $[KO_2]:[ХСА]$ је био 1:1.

4.3.6.2. Утицај реактивних кисеоничних врста на конформационе промене БСА испитане помоћу 5-МСЛ обележивача

Пошто сулфхидрилна група Cys-34 може да реагује са РОС, при чему се трансформише у сулфенску, сулфинску или сулфонску киселину (поглавље 2.1.2) [6,7], у овој дисертацији је утицај H_2O_2 и O_2^- на албумин испитан обележавањем БСА који је прво третиран са РОС, а потом обележен са 5-МСЛ. Таквим експерименталним приступом треба да се добију информације о:

- 1) конформационим променама БСА чија је сулфхидрилна група Cys-34 остала у свом редукованом стању (и последично је могла да веже 5-МСЛ), мерењем $2A_{max}$, τ_c (JV) и τ_c (SV);

- 2) количини сулфхидрилних група које нису подлегле оксидацији, рачунањем двоструког интеграла ЕПР спектра, који представља меру количине 5-МСЛ везаног за БСА.

Вредности $2A_{\max}$ и τ_c (JV) измерене за узорке БСА третиране са H_2O_2 и $\cdot O_2^-$ су значајно мање у односу на нетретиран БСА (табела 7), што указује на то да цеп Cys-34 постаје флексибилнији при оксидативном оштећењу. Са друге стране, τ_c (SV) је мањи за БСА третиран са H_2O_2 и $\cdot O_2^-$ у поређењу са нетретираним, што указује да окружење аминокиселина група за које је везан 5-МСЛ, такође, постаје флексибилније. За обе РОС двоструки интеграл спектра 5-МСЛ/БСА конјугата је смањен за око 10 % у поређењу са узорцима нетретираног БСА. Симулацијама су ЕПР спектри разложени на JV и СВ компоненту, и одређени су њихови удели. Како је N_{SV} за БСА третиран са РОС износио 4,5 %, као и у случају 5-МСЛ везаног за нетретиран БСА (поглавље 4.2), то би значило да је 10 % аминокиселина група и сулфхидрилних група оксидовано у реакцији са H_2O_2 и $\cdot O_2^-$. Оксидација релативно мале количине сулфхидрилних група (10 %) се слаже са литературним подацима према којима је овај процес релативно спор [7,156]. Из свега претходно наведеног закључује се да H_2O_2 и $\cdot O_2^-$ при коришћеним концентрацијама и $[РОС]:[БСА]$ моларним односима у малој мери оксидују Cys-34, а оксидативна оштећења се догађају и на другим местима на БСА, као нпр. аминокиселина групама које се налазе на површини БСА, при чему се догађају такве промене које узрокују повећање флексибилности Cys-34 цепа.

Табела 7. Вредности $2A_{\max}$, τ_c (JV) и τ_c (SV) за 5-МСЛ везан за БСА који је инкубиран са реактивним кисеоничним врстама (H_2O_2 и $\cdot O_2^-$), и за нетретиран узорак БСА.

	Нетретирани БСА	БСА + H_2O_2	БСА + $\cdot O_2^-$
$2A_{\max}$ [G]	$62,65 \pm 0,08$	$62,05 \pm 0,08$	$61,90 \pm 0,08$
τ_c (JV) [ns]	$13,9 \pm 0,9$	$11,8 \pm 0,9$	$9,5 \pm 0,9$
τ_c (SV) [ns]	$1,7 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$

*Концентрација БСА је у свим узорцима била 0,15 mM (у 50 mM фосфатном пуферу, pH 7,4). (Подаци приказани у табели представљају властите резултате преузете из рада аутора дисертације [123].)

5. Закључак

У овој дисертацији су испитане промене конформације хуманог (ХСА) и говеђег серумског албумина (БСА) методом спинског обележавања протеина и електронске парамагнетне резонантне (ЕПР) спектроскопије. Конформационе промене су индуковане варирањем температуре и рН, додавањем етанола, везивањем лиганата (масних киселина и лекова који се користе у свакодневној терапији) и излагањем дејству реактивних кисеоничних врста (H_2O_2 и $\cdot\text{O}_2^-$), а испитане су уз помоћ три различита спинска обележивача: 5-доксил-стеаринске киселине (5-ДС), 16-доксил-стеаринске киселине (16-ДС) и 3-малеимидо-проксила (5-МСЛ). У оквиру тога, испитана је осетљивост 5-ДС, 16-ДС и 5-МСЛ за детекцију конформационих промена ХСА и БСА, док испитивање утицаја етанола и везивања масних киселина и лекова за албумин доприноси бољем разумевању утицаја ових супстанција на поузданост дијагностичког теста који почива на спинском обележавању крвног серума/плазме. Такође, проучавање структурних промена и капацитета везивања ХСА и БСА при интеракцији са различитим лигандима, а пре свега са лековима, доприноси бољем разумевању фармакокинетики и фармакодинамике.

На основу резултата приказаних у оквиру ове дисертације, закључује се да спинско обележавање албумина доксил-стеаринским обележивачима и малеимидо-проксилом даје значајне информације о конформацији и капацитету за везивање масних киселина и лекова од стране овог протеина. Праћењем структурних промена ХСА и БСА индукованих различитим агенсима, закључено је да се ова три обележивача могу успешно користити за испитивање конформационих промена у албумину и да, уколико се сва три користе, дају комплетне информације о структурним променама албумина, због тога што се њихове аминоксилне групе налазе на различитим местима у протеину.

Детаљним испитивањем везивања 5-ДС и 16-ДС за ХСА, и 5-МСЛ за БСА закључено је следеће:

- 1) доксил група 5-ДС обележивача се налази у хидрофобној унутрашњости ХСА, док се у случају 16-ДС налази близу површине албумина;
- 2) ЕПР спектри 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА састоје из три главне компоненте које одговарају јако (ЈВ), слабо везаном (СВ) и невезаном (НВ) обележивачу;
- 3) у случају 5-МСЛ везаног за БСА, ЕПР спектри су разложени на две компоненте, ЈВ и СВ, при чему ЈВ потиче од 5-МСЛ везаног за цистеин на позицији 34 (Cys-34), док је за СВ детаљном анализом утврђено да се везује за аминок групе на површини БСА.

Проучавањем конформационих промена ХСА и БСА обележавањем ових протеина са доксил-стеаринским обележивачима и 5-МСЛ, редом, изведени су следећи закључци:

- 1) повећање температуре, мењање рН вредности од физиолошке ка киселој и базној средини, додавање етанола, као и везивање масних киселина и лекова утичу на промене у расподели 5-ДС и 16-ДС у ХСА и то тако да се удео ЈВ компоненте смањује, а расту удели СВ и НВ компоненте. Насупрот томе, водоник-пероксид и супероксидни анјонски радикал нису утицали на промене у везивању 5-ДС и 16-ДС за ХСА.
- 2) При термалној денатурацији албумина до 50-60 °С околина аминоксилних група сва три обележивача постаје флексибилнија услед одмотавања протеина. Са даљим повећањем температуре околина аминоксилних група 5-ДС и 5-МСЛ (везаног за Cys-34) лоцираних у хидрофобној унутрашњости албумина постаје све ригиднија, а за 16-ДС и 5-МСЛ везан за аминок групе БСА све флексибилнија. На вишим температурама долази до делимично реверзибилних промена структуре албумина, таквих да хидрофобни цепови постају све затворенији, што је последица термалне

агрегације, а са друге стране долази до одмотавања албумина на површини.

- 3) Варирањем рН је утврђено да околине сва три обележивача постају све флексибилније услед одмотавања албумина у средини која је киселија или базнија у односу на физиолошку (рН 7,4). При томе се показало да је:

- а) ширина ЕПР спектра, $2A_{\max}$, измерена за 5-ДС/ХСА осетљивија на промене рН у киселој средини у поређењу са 16-ДС/ХСА;
- б) удео НВ компоненте 16-ДС/ХСА комплекса уопштено осетљивији на промене рН.

Треба нагласити да одмотавање БСА, индуковано кисело-базним прелазима, за последицу има не само отварање Cys-34 цепа, већ и повећану покретљивост аминокиселина на површини БСА.

- 4) Денатурација ХСА и БСА етанолом, такође, води разматавању ових протеина, што се у случају 5-ДС/ХСА и 5-МСЛ/БСА манифестује као смањење ширине ЕПР спектра услед повећане флексибилности околине ових обележивача. Такође, 5-МСЛ везан за аминокиселине на површини БСА је показао повећану мобилност. Насупрот томе, ширина ЕПР спектра 16-ДС/ХСА се повећавала, што може да говори или о повећаној ригидности, или, што је вероватније, о повећаној поларности околине доксил групе 16-ДС, која услед разматавања ХСА постаје изложенија растварачу.

- 5) Испитивањем утицаја везивања масних киселина и лекова на конформацију и капацитет везивања албумина дошло се до следећих закључака:

- а) за сва три обележивача у присуству лиганада долази до промене у ширини ЕПР спектра, одкале се закључује следеће:

- i. Обележивачи 5-ДС и 16-ДС се везују за друга места на ХСА уколико су за њега везани лиганди.

- ii. За 5-МСЛ/БСА је уочено да:

- везивање лиганада не утиче на околинску аминокиселинску групу БСА;

- везивање масних киселина за БСА доводи до отварања Cys-34 цепа;
- везивање лекова за иста места у БСА утиче на различите начине на околину Cys-34.

б) Промене параметара израчунатих из ЕПР спектра (ширине ЕПР спектра, и удели ЈВ, СВ, и НВ) 5-ДС/ХСА, 16-ДС/ХСА и 5-МСЛ/БСА не зависе од места везивања лекова, већ од начина везивања лека (оријентације молекула лека и интеракција са местом везивања) и његове молекулске структуре.

- б) Водоник-пероксид и супероксидни анјонски радикал при коришћеним коцнетрацијама не мењају капацитет албумина за везивање масних киселина, али доводе до оксидативних оштећења која се испољавају кроз отварање Cys-34 цепа, повећање мобилности аминокиселина на површини албумина, као и кроз оксидацију ових група.

На основу свих резултата се закључује да је ЕПР/спинско обележавање методологија која има велики потенцијал за будућа испитивања албумина, као и за примену 5-ДС и 5-МСЛ у дијагностичким тестовима, какав је већ развијен за 16-ДС.

6. Литература

- [1] T.W. Evans, Albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16 (2002) 6–11.
- [2] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: From bench to bedside, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 209–290.
- [3] T. Peters Jr., *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press: Copperstown, NY, 1995.
- [4] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*. 57 (2005) 787–796.
- [5] C.D. Kanakis, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, S. Diamantoglou, H.A. Tajmir-Riahi, Antioxidant flavonoids bind human serum albumin, *J. Mol. Struct.* 798 (2006) 69–74.
- [6] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans, Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential, *Hepatology*. 41 (2005) 1211–1219.
- [7] S. Carballal, R. Radi, M.C. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman, B. Alvarez, Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Biochemistry (Mosc.)*. 42 (2003) 9906–9914.
- [8] D.C. Carter, J.X. Ho, Structure of serum albumin, in: J.T.E. C.B. Anfinsen Frederic M. Richards and David S. Eisenberg (Ed.), *Adv. Protein Chem.*, Academic Press, 1994: pp. 153–203.
- [9] E.L. Gelamo, M. Tabak, Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, *Spectrochim. Acta. A* 56 (2000) 2255–2271.

- [10] P. Taboada, S. Barbosa, E. Castro, M. Gutiérrez-Pichel, V. Mosquera, Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents, *Chem. Phys.* 340 (2007) 59–68.
- [11] E.L. Gelamo, R. Itri, A. Alonso, J.V. da Silva, M. Tabak, Small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 277 (2004) 471–482.
- [12] A. Rogozea, I. Matei, I.M. Turcu, G. Ionita, V.E. Sahini, A. Salifoglou, EPR and circular dichroism solution studies on the interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants and β -cyclodextrin, *J. Phys. Chem. B.* 116 (2012) 14245–14253.
- [13] D.P. Cistola, D.M. Small, J.A. Hamilton, Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites., *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10971–10979.
- [14] G. Barone, C. Giancola, A. Verdoliva, DSC studies on the denaturation and aggregation of serum albumins, *Thermochim. Acta.* 199 (1992) 197–205.
- [15] V. Militello, V. Vetri, M. Leone, Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin, *Biophys. Chem.* 105 (2003) 133–141.
- [16] K. Nakamura, S. Era, Y. Ozaki, M. Sogami, T. Hayashi, M. Murakami, Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy, *FEBS Lett.* 417 (1997) 375–378.
- [17] L.J. Berliner, *Spin labeling. Theory and applications*, Academic Press Inc.: New York, 1976.
- [18] J.P. Klare, Site-directed spin labeling EPR spectroscopy in protein research, *Biol. Chem.* 394 (2013) 1281–1300.

- [19] S.J. Rehfeld, D.J. Eatough, W.Z. Plachy, The binding isotherms for the interaction of 5-doxyl stearic acid with bovine and human albumin., *J. Lipid Res.* 19 (1978) 841–849.
- [20] M.J.N. Junk, H.W. Spiess, D. Hinderberger, The distribution of fatty acids reveals the functional structure of human serum albumin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 8755–8759.
- [21] Y. Akdogan, M.J.N. Junk, D. Hinderberger, Effect of ionic liquids on the solution structure of human serum albumin, *Biomacromolecules.* 12 (2011) 1072–1079.
- [22] I. Matei, A.M. Ariciu, M.V. Neacsu, A. Collauto, A. Salifoglou, G. Ionita, Cationic spin probe reporting on thermal denaturation and complexation–decomplexation of BSA with SDS. Potential applications in protein purification processes, *J. Phys. Chem. B.* 118 (2014) 11238–11252.
- [23] D.F.H. Wallach, S.P. Verma, E. Weidekamm, V. Bieri, Hydrophobic binding sites in bovine serum albumin and erythrocyte ghost proteins. Study by spin-labelling, paramagnetic fluorescence quenching and chemical modification, *Biochim. Biophys. Acta* 356 (1974) 68–81.
- [24] A. Gurachevsky, E. Shimanovitch, T. Gurachevskaya, V. Muravsky, Intra-albumin migration of bound fatty acid probed by spin label ESR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360 (2007) 852–856.
- [25] C. Lagercrantz, M. Setaka, Some binding properties of human serum albumin as studied by the spin labels 12-doxyl stearic acid and its methyl ester, *Acta Chem. Scand. B.* 29 (1975) 397–398.
- [26] J.D. Morrisett, H.J. Pownall, A.M. Gotto, Bovine serum albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids., *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 2487–2494.
- [27] H. Heinrich Ruf, M. Gratzl, Binding of nitroxide stearate spin labels to bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 446 (1976) 134–142.

- [28] C. Lagercrantz, T. Larsson, H. Karlsson, M. Setaka, Quantitative studies on competitive ligand binding to bovine serum albumin by use of the spin label 5-doxyl dodecanoic acid, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 83 (1978) 197–203.
- [29] C.B. Berde, B.S. Hudson, R.D. Simoni, L.A. Sklar, Human serum albumin. Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin., *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 391–400.
- [30] R.C. Perkins, N. Abumrad, K. Balasubramanian, L.R. Dalton, A.H. Beth, J.H. Park, C.R. Park, Equilibrium binding of spin-labeled fatty acids to bovine serum albumin: suitability as surrogate ligands for natural fatty acids, *Biochemistry (Mosc.)*. 21 (1982) 4059–4064. doi:10.1021/bi00260a023.
- [31] T.G. Gantchev, M.B. Shopova, Characterization of spin-labelled fatty acids and hematoporphyrin binding sites interactions in serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1037 (1990) 422–434.
- [32] M. Ge, S.B. Rananavare, J.H. Freed, ESR studies of stearic acid binding to bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1036 (1990) 228–236.
- [33] H. Yuan, W.E. Antholine, W.K. Subczynski, M.A. Green, Release of CuPTSM from human serum albumin after addition of fatty acids, *J. Inorg. Biochem.* 61 (1996) 251–259.
- [34] V.A. Livshits, D. Marsh, Fatty acid binding sites of serum albumin probed by non-linear spin-label EPR, *Biochim. Biophys. Acta* 1466 (2000) 350–360.
- [35] D. de Sousa Neto, C.E.G. Salmon, A. Alonso, M. Tabak, Interaction of bovine serum albumin (BSA) with ionic surfactants evaluated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 70 (2009) 147–156.
- [36] V. Muravsky, T. Gurachevskaya, S. Berezenko, K. Schnurr, A. Gurachevsky, Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR, *Spectrochim. Acta. A.* 74 (2009) 42–47.

- [37] Y. Akdogan, D. Hinderberger, Solvent-Induced Protein Refolding at Low Temperatures, *J. Phys. Chem. B.* 115 (2011) 15422–15429.
- [38] M.J.N. Junk, H.W. Spiess, D. Hinderberger, DEER in biological multispin-systems: A case study on the fatty acid binding to human serum albumin, *J. Magn. Reson.* 210 (2011) 210–217.
- [39] Y. Akdogan, Y. Wu, K. Eisele, M. Schaz, T. Weil, D. Hinderberger, Host–guest interactions in polycationic human serum albumin bioconjugates, *Soft Matter.* 8 (2012) 11106–11114.
- [40] J. Reichenwallner, D. Hinderberger, Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 5382–5393.
- [41] O. Dömötör, A. Rathgeb, P.-S. Kuhn, A. Popović-Bijelić, G. Bačić, E.A. Enyedy, V.B. Arion, Investigation of the binding of cis/trans-[MCl₄(1H-indazole)(NO)][−] (M = Ru, Os) complexes to human serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 159 (2016) 37–44.
- [42] M. Tabak, S. Neto, D. De, C.E.G. Salmon, On the interaction of bovine serum albumin (BSA) with cethyltrimethyl ammonium chloride surfactant: electron paramagnetic resonance (EPR) study, *Braz. J. Phys.* 36 (2006) 83–89.
- [43] T.G. Gantchev, R. Ouellet, J.E. van Lier, Binding interactions and conformational changes induced by sulfonated aluminum phthalocyanines in human serum albumin, *Arch. Biochem. Biophys.* 366 (1999) 21–30.
- [44] E.V. Muravskaya, A.G. Lapko, V.A. Muravskii, Modification of transport function of plasma albumin during atherosclerosis and diabetes mellitus, *Bull. Exp. Biol. Med.* 135 (2003) 433–435.
- [45] R. Jalan, K. Schnurr, R.P. Mookerjee, S. Sen, L. Cheshire, S. Hodges, V. Muravsky, R. Williams, G. Matthes, N.A. Davies, Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality, *Hepatology.* 50 (2009) 555–564.

- [46] A. Gurachevsky, S.C. Kazmierczak, A. Jörres, V. Muravsky, Application of spin label electron paramagnetic resonance in the diagnosis and prognosis of cancer and sepsis, *Clin. Chem. Lab. Med.* 46 (2008).
- [47] S.C. Kazmierczak, A. Gurachevsky, G. Matthes, V. Muravsky, Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring, *Clin. Chem.* 52 (2006) 2129–2134.
- [48] A. Gurachevsky, E. Muravskaya, T. Gurachevskaya, L. Smirnova, V. Muravsky, Cancer-associated alteration in fatty acid binding to albumin studied by spin-label electron spin resonance, *Cancer Invest.* 25 (2007) 378–383.
- [49] M. Gelos, D. Hinderberger, E. Welsing, J. Belting, K. Schnurr, B. Mann, Analysis of albumin fatty acid binding capacity in patients with benign and malignant colorectal diseases using electron spin resonance (ESR) spectroscopy, *Int. J. Colorectal Dis.* 25 (2010) 119–127.
- [50] M. Moergel, P.W. Kämmerer, K. Schnurr, M.O. Klein, B. Al-Nawas, Spin electron paramagnetic resonance of albumin for diagnosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC), *Clin. Oral Investig.* 16 (2011) 1529–1533.
- [51] P. Seidel, A. Gurachevsky, V. Muravsky, K. Schnurr, G. Seibt, G. Matthes, Recognition of malignant processes with neural nets from ESR spectra of serum albumin, *Z. Für Med. Phys.* 15 (2005) 265–272.
- [52] A.A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin, *J. Mol. Biol.* 303 (2000) 721–732.
- [53] I. Petitpas, T. Grüne, A.A. Bhattacharya, S. Curry, Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, *J. Mol. Biol.* 314 (2001) 955–960.
- [54] C.N. Cornell, L.J. Kaplan, Spin-label studies of the sulfhydryl environment in bovine plasma albumin. 1. The N-F transition and acid expansion., *Biochemistry (Mosc.)*. 17 (1978) 1750–1754.

- [55] C.N. Cornell, L.J. Kaplan, Spin-label studies on the sulfhydryl environment in bovine plasma albumin. 2. The neutral transition and the A isomer, *Biochemistry (Mosc.)*. 17 (1978) 1755–1758.
- [56] R. Wetzel, M. Becker, J. Behlke, H. Billwitz, S. Böhm, B. Ebert, H. Hamann, J. Krumbiegel, G. Lassmann, Temperature behaviour of human serum albumin, *Eur. J. Biochem.* 104 (1980) 469–478.
- [57] C.N. Cornell, R. Chang, L.J. Kaplan, The environment of the sulfhydryl group in human plasma albumin as determined by spin labeling, *Arch. Biochem. Biophys.* 209 (1981) 1–6.
- [58] J.L.V. Anjos, P.S. Santiago, M. Tabak, A. Alonso, On the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants: temperature induced EPR changes of a maleimide nitroxide reflect local protein dynamics and probe solvent accessibility, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 88 (2011) 463–470.
- [59] M. Pantusa, L. Sportelli, R. Bartucci, Spectroscopic and calorimetric studies on the interaction of human serum albumin with DPPC/PEG:2000-DPPE membranes, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 961–973.
- [60] O.H. Griffith, H.M. McConnell, A nitroxide-maleimide spin label, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55 (1966) 8–11.
- [61] G. Benga, S.J. Strach, Interpretation of the electron spin resonance spectra of nitroxide-maleimide-labelled proteins and the use of this technique in the study of albumin and biomembranes, *Biochim. Biophys. Acta* 400 (1975) 69–79.
- [62] J.R. Simard, P.A. Zunszain, J.A. Hamilton, S. Curry, Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis, *J. Mol. Biol.* 361 (2006) 336–351.
- [63] D.P. Cistola, D.M. Small, Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study., *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 1431–1441.

- [64] L. Gaté, J. Paul, G.N. Ba, K.D. Tew, H. Tapiero, Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants, *Biomed. Pharmacother.* 53 (1999) 169–180.
- [65] M. Bernardi, C. Maggioli, G. Zaccherini, Human albumin in the management of complications of liver cirrhosis, *Crit. Care.* 16 (2012) 211..
- [66] A. Bujacz, Structures of bovine, equine and leporine serum albumin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 1278–1289.
- [67] S. Arques, P. Ambrosi, Human serum albumin in the clinical syndrome of heart failure, *J. Card. Fail.* 17 (2011) 451–458.
- [68] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature.* 358 (1992) 209–215.
- [69] K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal, M.D. Zimmerman, K. Jablonska, A.J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins, *Mol. Immunol.* 52 (2012) 174–182.
- [70] S. Allenmark, Optical resolution by liquid chromatography on immobilized bovine serum albumin, *J. Liq. Chromatogr.* 9 (1986) 425–442.
- [71] K. Langer, S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. von Briesen, D. Schubert, Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 257 (2003) 169–180.
- [72] N. Ahmed, D. Dobler, M. Dean, P.J. Thornalley, Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5724–5732.
- [73] A.V. Elgersma, R.L.J. Zsom, W. Norde, J. Lyklema, The adsorption of bovine serum albumin on positively and negatively charged polystyrene latices, *J. Colloid Interface Sci.* 138 (1990) 145–156.

- [74] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Eng.* 12 (1999) 439–446.
- [75] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [76] M. Yamasaki, H. Yano, K. Aoki, Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: I. Effects of pH and ionic strength, *Int. J. Biol. Macromol.* 12 (1990) 263–268.
- [77] M. Dockal, D.C. Carter, F. Rüker, Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3042–3050.
- [78] H.J. Nikkel, J.F. Foster, Reversible sulfhydryl-catalyzed structural alteration of bovine mercaptalbumin, *Biochemistry (Mosc.)*. 10 (1971) 4479–4486.
- [79] A.K. Shaw, S.K. Pal, Spectroscopic studies on the effect of temperature on pH-induced folded states of human serum albumin, *J. Photochem. Photobiol. B*. 90 (2008) 69–77.
- [80] J.P. Doweiko, D.J. Nompleggi, Role of Albumin in Human Physiology and Pathophysiology, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 15 (1991) 207–211.
- [81] J.A. Kellum, Determinants of blood pH in health and disease, *Crit. Care*. 4 (2000) 6.
- [82] M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1783–1787.
- [83] L. Papatheodorou, N. Weiss, Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia, *Antioxid. Redox Signal.* 9 (2007) 1941–1958.

- [84] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 5444–5455.
- [85] B. Sekula, K. Zielinski, A. Bujacz, Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5-diiodosalicylic acid, *Int. J. Biol. Macromol.* 60 (2013) 316–324.
- [86] A. Bujacz, K. Zielinski, B. Sekula, Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 82 (2014) 2199–2208.
- [87] Q.-M. Wang, W. Gao, J.-L. Song, Y. Liu, H. Qi, X.-H. Tang, Synthesis, X-ray crystallographic analysis and BSA interaction of a new α -aminophosphonate, *J. Appl. Spectrosc.* 83 (2016) 703–709.
- [88] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 824–832.
- [89] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 1052–1061.
- [90] D.C. Carter, X. He, S.H. Munson, P.D. Twigg, K.M. Gernert, M.B. Broom, T.Y. Miller, Three-dimensional structure of human serum albumin, *Science.* 244 (1989) 1195–1198.
- [91] D.C. Carter, X.-M. He, Structure of human serum albumin, *Science.* 249 (1990) 302–303.
- [92] A.A. Bhattacharya, S. Curry, N.P. Franks, Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38731–38738.
- [93] I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin. Anatomy of drug site I, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22804–22809.

- [94] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J. Mol. Biol.* 353 (2005) 38–52.
- [95] J.L. Moreland, A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, P.E. Bourne, The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications, *BMC Bioinformatics.* 6 (2005) 21.
- [96] D. Xu, Y. Zhang, Generating triangulated macromolecular surfaces by euclidean distance transform, *PLOS ONE.* 4 (2009) e8140.
- [97] U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri, Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695–704.
- [98] F. Zsila, Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 1668–1682.
- [99] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 5 (1998) 827–835.
- [100] M. Brustolon, *Electron paramagnetic resonance: A practitioner's toolkit*, John Wiley & Sons, 2009.
- [101] F. Gerson, W. Huber, *Electron spin resonance spectroscopy of organic radicals*, John Wiley & Sons, 2003.
- [102] J.A. Weil, J.R. Bolton, *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications*, John Wiley & Sons, 2007.
- [103] J.E. Wertz, J.R. Bolton, *Electron spin resonance: Elementary theory and practical applications*, Chapman and Hall, 1986.

- [104] D.M. Murphy, EPR (electron paramagnetic resonance) spectroscopy of polycrystalline oxide systems, in: S.D. Jackson, J.S.J. Hargreaves (eds.) *Metal Oxide Catalysis*, Wiley-Blackwell, 2009: pp. 1–50.
- [105] А. Поповић-Бијелић, М. Мојовић, Практикум из биофизичке хемије, Факултет за физичку хемију Универзитета у Београду, 2013.
- [106] G.R. Eaton, S.S. Eaton, D.P. Barr, R.T. Weber, *Quantitative EPR*, Springer Science & Business Media, 2010.
- [107] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 1073–1101.
- [108] J.R. Smith, M.T. Cicerone, C.W. Meuse, Tertiary Structure Changes in Albumin upon Surface Adsorption Observed via Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Langmuir*. 25 (2009) 4571–4578.
- [109] J.P. Allen, *Biophysical chemistry*, John Wiley & Sons, 2009.
- [110] Protein Fluorescence, in: J. R. Lakowicz (eds) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, Boston, MA, 2006: pp. 529–575.
- [111] T.I. Smirnova, M.A. Voinov, A.I. Smirnov, Spin probes and spin labels, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, American Cancer Society, 2009.
- [112] R. Hicks, *Stable radicals: Fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds*, 1st edition, Wiley, 2011.
- [113] G.I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A.I. Smirnov, R. Tamura, *Nitroxides: applications in chemistry, biomedicine, and materials science*, John Wiley & Sons, 2008.
- [114] W.L. Hubbell, H.S. Mchaourab, C. Altenbach, M.A. Lietzow, Watching proteins move using site-directed spin labeling, *Structure*. 4 (1996) 779–783.
- [115] G.E. Fanucci, D.S. Cafiso, Recent advances and applications of site-directed spin labeling, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16 (2006) 644–653.

- [116] W.R. Hagen, *Biomolecular EPR Spectroscopy*, CRC Press, 2008.
- [117] Y. Tkachev, V. Timofeev, Uniform EPR spectra analysis of spin-labeled macromolecules by temperature and viscosity dependences, in: A.I. Kokorin (eds.) INTECH Open Access Publisher, 2012: pp. 285-314.
- [118] M.J.N. Junk, H.W. Spiess, D. Hinderberger, Characterization of the solution structure of human serum albumin loaded with a metal porphyrin and fatty acids, *Biophys. J.* 100 (2011) 2293–2301.
- [119] M. Pantusa, L. Sportelli, R. Bartucci, Transfer of stearic acids from albumin to polymer-grafted lipid containing membranes probed by spin-label electron spin resonance, *Biophys. Chem.* 114 (2005) 121–127.
- [120] F. De Simone, R. Guzzi, L. Sportelli, D. Marsh, R. Bartucci, Electron spin-echo studies of spin-labelled lipid membranes and free fatty acids interacting with human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1541–1549.
- [121] H.H. Hull, R. Chang, L.J. Kaplan, On the location of the sulfhydryl group in bovine plasma albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 400 (1975) 132–136.
- [122] C. Marculescu, H. Kossen, R. E. Morgan, P. Mayer, S. A. Fletcher, B. Tolner, K. A. Chester, L. H. Jones, J. R. Baker, Aryloxymaleimides for cysteine modification, disulfide bridging and the dual functionalization of disulfide bonds, *Chem. Commun.* 50 (2014) 7139–7142.
- [123] A. Pavićević, J. Luo, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin, *Eur. Biophys. J.* 46 (2017) 773–787.
- [124] Y. Ni, Q. Zhang, S. Kokot, Analysis of the interactions of mixtures of two β -agonists steroids with bovine serum albumin: a fluorescence spectroscopy and chemometrics investigation, *Analyst.* 135 (2010) 2059–2068.

- [125] J. Strancar, T. Koklic, Z. Arsov, B. Filipic, D. Stopar, M.A. Hemminga, Spin label EPR-based characterization of biosystem complexity, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (2005) 394–406.
- [126] J. Strancar, EPRSIM-C: a spectral analysis package, *ESR Spectrosc. Membr. Biophys.* (2007) 323–338.
- [127] S. Stoll, A. Schweiger, EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, *J. Magn. Reson.* 178 (2006) 42–55.
- [128] E. Etienne, N. Le Breton, M. Martinho, E. Mileo, V. Belle, SimLabel: a graphical user interface to simulate continuous wave EPR spectra from site-directed spin labeling experiments, *Magn. Reson. Chem.* 55 (2017) 714–719.
- [129] A.A. Pavićević, A.D. Popović-Bijelić, M.D. Mojović, S.V. Šušnjar, G.G. Bačić, Binding of doxyl stearic spin labels to human serum albumin: An EPR study, *J. Phys. Chem. B.* 118 (2014) 10898–10905.
- [130] A.A. Spector, Fatty acid binding to plasma albumin., *J. Lipid Res.* 16 (1975) 165–179.
- [131] J.A. Hamilton, D.P. Cistola, J.D. Morrisett, J.T. Sparrow, D.M. Small, Interactions of myristic acid with bovine serum albumin: a ¹³C NMR study, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984) 3718–3722.
- [132] R. Bakalova, Z. Zhelev, I. Aoki, T. Saga, Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 2503–2517.
- [133] S. Schreier-Muccillo, D. Marsh, I.C.P. Smith, Monitoring the permeability profile of lipid membranes with spin probes, *Arch. Biochem. Biophys.* 172 (1976) 1–11.
- [134] J.M.K. Slane, C.-S. Lai, J.S. Hyde, A proton relaxation enhancement investigation of the binding of fatty acid spin labels to human serum albumin, *Magn. Reson. Med.* 3 (1986) 699–706.

- [135] M. Sentjurc, G. Bacic, H.M. Swartz, Reduction of doxyl stearates by ascorbate in unilamellar liposomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 282 (1990) 207–213.
- [136] A.J. Stewart, C.A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth, P.J. Sadler, Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin, *FEBS J.* 272 (2005) 353–362.
- [137] R.K. Mitra, S.S. Sinha, S.K. Pal, Hydration in protein folding: thermal unfolding/refolding of human serum albumin, *Langmuir* 23 (2007) 10224–10229.
- [138] K. Flora, J.D. Brennan, G.A. Baker, M.A. Doody, F.V. Bright, Unfolding of acrylodan-labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence methods, *Biophys. J.* 75 (1998) 1084–1096.
- [139] V. Vetri, F. Librizzi, M. Leone, V. Militello, Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 717–725.
- [140] G.A. Picó, Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin, *Int. J. Biol. Macromol.* 20 (1997) 63–73.
- [141] S. Gumpen, P.O. Hegg, H. Martens, Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 574 (1979) 189–196.
- [142] V.A. Borzova, K.A. Markossian, N.A. Chebotareva, S.Y. Kleymenov, N.B. Poliansky, K.O. Muranov, V.A. Stein-Margolina, V.V. Shubin, D.I. Markov, B.I. Kurganov, Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin, *PLOS ONE*. 11 (2016) e0153495.
- [143] M. Yamasaki, H. Yano, K. Aoki, Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: II. Effects of neutral salts and urea, *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 322–328.

- [144] J.R. Kanicky, D.O. Shah, Effect of premicellar aggregation on the pKa of fatty acid soap solutions, *Langmuir*. 19 (2003) 2034–2038.
- [145] N.A. Avdulov, S.V. Chochina, V.A. Daragan, F. Schroeder, K.H. Mayo, W.G. Wood, Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: A fluorescent and ¹³C nmr multiplet relaxation study, *Biochemistry (Mosc.)*. 35 (1996) 340–347.
- [146] Y.A. Gryzunov, A. Arroyo, J.-L. Vigne, Q. Zhao, V.A. Tyurin, C.A. Hubel, R.E. Gandley, Y.A. Vladimirov, R.N. Taylor, V.E. Kagan, Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper–albumin complexes from antioxidants to prooxidants, *Arch. Biochem. Biophys.* 413 (2003) 53–66.
- [147] P. Ascenzi, M. Fasano, Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin, *Biophys. Chem.* 148 (2010) 16–22.
- [148] T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1607–1612.
- [149] A. di Masi, F. Gullotta, A. Bolli, G. Fanali, M. Fasano, P. Ascenzi, Ibuprofen binding to secondary sites allosterically modulates the spectroscopic and catalytic properties of human serum heme–albumin, *FEBS J.* 278 (2011) 654–662.
- [150] U. Kragh-Hansen, Relations between high-affinity binding sites for l-tryptophan, diazepam, salicylate and Phenol Red on human serum albumin, *Biochem. J.* 209 (1983) 135–142.
- [151] F.G. Larsen, C.G. Larsen, P. Jakobsen, R. Brodersen, Interaction of warfarin with human serum albumin. A stoichiometric description., *Mol. Pharmacol.* 27 (1985) 263–270.
- [152] J. Shi, D. Pan, M. Jiang, T.-T. Liu, Q. Wang, Binding interaction of ramipril with bovine serum albumin (BSA): Insights from multi-spectroscopy and molecular docking methods, *J. Photochem. Photobiol. B.* 164 (2016) 103–111.

- [153] T. Maruyama, M.A. Furuie, S. Hibino, M. Otagiri, Comparative study of interaction mode of diazepines with human serum albumin and α -acid glycoprotein, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 16–20.
- [154] Y. Zhang, P. Lee, S. Liang, Z. Zhou, X. Wu, F. Yang, H. Liang, Structural basis of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac binding to human serum albumin, *Chem. Biol. Drug Des.* 86 (2015) 1178–1184.
- [155] B. Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1147–1150.
- [156] S. Carballal, B. Alvarez, L. Turell, H. Botti, B.A. Freeman, R. Radi, Sulfenic acid in human serum albumin, *Amino Acids.* 32 (2007) 543–551. doi:10.1007/s00726-006-0430-y.

Биографија

Александра Павићевић је рођена 23.06.1988. године у Београду. Основну школу и гимназију је завршила у Београду. Факултет за физичку хемију уписала је 2006/2007. школске године. Дипломирани физикохемичар постала је 2010. године (просечна оцена 9,81) одбраном дипломског рада „Компаративна анализа производње слободних радикала у тумору и здравом ткиву применом ЕПР спектрометрије“. Мастер студије на Факултету за физичку хемију завршила је 2011. године са просечном оценом 10,00 одбраном мастер рада „Анализа способности везивања масних киселина за албумин код пацијената са тумором дојке коришћењем електронске парамагнетне резонанције (ЕПР)“. У школској 2011/2012. години је уписала докторске студије на Факултету за физичку хемију.

Од 1.12.2011. запослена је као истраживач приправник на Факултету за физичку хемију на пројекту ИИИ41005 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије „Биомаркери у неуродегенеративним и малигним процесима“. Звање истраживач сарадник стекла је у септембру 2013. године. Од 1.11.2014. запослена је на Факултету за физичку хемију као асистент.

Александра Павићевић је била стипендисткиња Министарства просвете Владе Републике Србије за школску 2007/2008. годину, стипендисткиња Републичке фондације за развој научног и уметничког подмлатка 2008/2009. и стипендисткиња Фонда за младе таленте Министарства омладине и спорта 2009/2010. и 2010/2011. Добитница је специјалног признања Српског хемијског друштва за изузетан успех у току студија (2011).

Аутор је или коаутор 10 научних радова публикованих у међународним часописима (6 категорије М21, 3 категорије М22 и 1 категорије М23), од чега су 2 рада из докторске дисертације (1 категорије М21 и категорије М23), при чему је први аутор на оба рада.

Научни радови у којима су публиковани резултати из докторске дисертације

Радови у врхунским међународним часописима, M21:

1. **A. Pavićević**, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, G. Bačić, Binding of Doxyl Stearic Spin Labels to Human Serum Albumin: An EPR Study, The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(37), 10898-10905.

Радови у истакнутим међународним часописима, M23:

1. **A. Pavićević**, J. Luo, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin, European Biophysics Journal, 2017, 46(8), 773-787.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Павићевић

број индекса 2011/0307

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Примена електронске парамагнетне резонантне спектроскопије за испитивање конформационих промена албумина методом спинског обележавања“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 7.8.2018.

Александра Павићевић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Александра Павићевић
Број индекса 0307/2011
Студијски програм Докторске академске студије – физичка хемија
Наслов рада „Примена електронске парамагнетне резонантне
спектроскопије за испитивање конформационих промена албумина
методом спинског обележавања“
Ментор др Милош Мојовић, ванредни професор Факултета за
физичку хемију, Универзитета у Београду

Потписани/а Александра Павићевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 7.8.2018.

Александра Павићевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Примена електронске парамагнетне резонантне спектроскопије за испитивање конформационих промена албумина методом спинског обележавања“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 7.8.2018.

Aleksandra Tabutek

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.